

PCT

ORGANISATION MONDIALE DE LA PROPRIETE INTELLECTUELLE  
Bureau international



DEMANDE INTERNATIONALE PUBLIEE EN VERTU DU TRAITE DE COOPERATION EN MATIERE DE BREVETS (PCT)

(51) Classification internationale des brevets 5 :  C12N 15/53	A1	(11) Numéro de publication internationale: WO 94/01564  (43) Date de publication internationale: 20 janvier 1994 (20.01.94)
----------------------------------------------------------------------	----	-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------

(21) Numéro de la demande internationale: PCT/FR93/00676  (22) Date de dépôt international: 2 juillet 1993 (02.07.93)  (30) Données relatives à la priorité: 92/08254 3 juillet 1992 (03.07.92) FR  (71) Déposant ( <i>pour tous les Etats désignés sauf US</i> ): ORSAN [FR/FR]; 16, rue Ballu, F-75009 Paris (FR).  (72) Inventeurs; et (75) Inventeurs/Déposants ( <i>US seulement</i> ): KAZMAIER, Michael [DE/FR]; 5, rue Sophie-Germain, F-75014 Paris (FR). POMPON, Denis [FR/FR]; 9, place du Marché-Neuf, Chevry II, F-91190 Gif-sur-Yvette (FR). MIGNOTTE VIEUX, Claudia [FR/FR]; 16, rue de la Trompette, F-17000 La Rochelle (FR). TEUTSCH, Hermann [DE/DE]; Schmelzlingstal 5, D-7630 Lahr (DE). WERK-REICHART, Danielle [FR/FR]; 3, rue de Bagdad, F-67370 Dingsheim (FR). RENAUD, Michel [FR/FR]; 23, rue des Causses, F-91953 Les Ulis (FR).	(74) Mandataire: WARCOIN, Jacques; Cabinet Regimbeau, 26, avenue Kléber, F-75116 Paris (FR).  (81) Etats désignés: CA, JP, US, brevet européen (AT, BE, CH, DE, DK, ES, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE).  Publiée <i>Avec rapport de recherche internationale. Avant l'expiration du délai prévu pour la modification des revendications, sera republiée si de telles modifications sont reçues.</i>
--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------	---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------

(54) Title: YEAST STRAIN FOR THE CO-EXPRESSION OF A PLANT CYTOCHROME P450 MONO-OXYGENASE ACTIVITY AND AN ENDOGENOUS OR HETEROLOGOUS NADPH-CYTOCHROME P450-REDUCTASE, AND USE THEREOF IN BIOCONVERSION

(54) Titre: SOUCHE DE LEVURE PERMETTANT LA CO-EXPRESSION D'UNE ACTIVITE MONO-OXYGENASE DE CYTOCHROME P450 DE PLANTE ET D'UNE NADPH-CYTOCHROME P450-REDUCTASE ENDOGENE OU HETEROLOGUE ET SON UTILISATION A DES FINS DE BIOCONVERSION

(57) Abstract

A yeast strain for the co-expression of a plant cytochrome P450 mono-oxygenase activity and an endogenous or heterologous NADPH-cytochrome P450-reductase, wherein one of the NADPH-cytochrome P450-reductase or cytochrome P450 genes is integrated into the chromosome of said strain, and the strain is transformed by a vector having an expression cassette for the other gene. The use of said yeast strain, as well as a cDNA sequence coding for cytochrome P450 CA4H of the Jerusalem artichoke *Helianthus tuberosus* or *Arabidopsis thaliana*, for bioconversion purposes, is also disclosed.

(57) Abrégé

La présente invention concerne une souche de levure permettant la co-expression d'une activité mono-oxygénase de cytochrome P450 de plante et d'une NADPH-cytochrome P450-réductase endogène ou hétérologue, caractérisée en ce que l'un des gènes de la NADPH-cytochrome P450-réductase ou du cytochrome P450 est intégré dans le chromosome de ladite souche, et la souche est transformée par un vecteur portant une cassette d'expression de l'autre gène. L'invention concerne également l'utilisation à des fins de bioconversion de ladite souche de levure ainsi qu'une séquence d'ADN codant pour le cytochrome P450 CA4H de topinambour *Helianthus tuberosus* ou d'*Arabidopsis thaliana*.

**UNIQUEMENT A TITRE D'INFORMATION**

**Codes utilisés pour identifier les Etats parties au PCT, sur les pages de couverture des brochures publiant des demandes internationales en vertu du PCT.**

AT	Autriche	FR	France	MR	Mauritanie
AU	Australie	CA	Gabon	MW	Malawi
BB	Barbade	GB	Royaume-Uni	NE	Niger
BE	Belgique	GN	Guinée	NL	Pays-Bas
BF	Burkina Faso	GR	Grèce	NO	Norvège
BG	Bulgarie	HU	Hongrie	NZ	Nouvelle-Zélande
BJ	Bénin	IE	Irlande	PL	Pologne
BR	Brésil	IT	Italie	PT	Portugal
BY	Bélarus	JP	Japon	RO	Roumanie
CA	Canada	KP	République populaire démocratique de Corée	RU	Fédération de Russie
CF	République Centrafricaine	KR	République de Corée	SD	Soudan
CG	Congo	KZ	Kazakhstan	SE	Suède
CH	Suisse	LI	Lichtenstein	SI	Slovénie
CI	Côte d'Ivoire	LK	Sri Lanka	SK	République slovaque
CM	Cameroun	LU	Luxembourg	SN	Sénégal
CN	Chine	LV	Lettonie	TD	Tchad
CS	Tchécoslovaquie	MC	Monaco	TG	Togo
CZ	République tchèque	MG	Madagascar	UA	Ukraine
DE	Allemagne	ML	Mali	US	Etats-Unis d'Amérique
DK	Danemark	MN	Mongolie	UZ	Ouzbékistan
ES	Espagne			VN	Viet Nam
FI	Finlande				

**"SOUCHE DE LEVURE PERMETTANT LA CO-EXPRESSION D'UNE ACTIVITE MONO-OXYGENASE DE CYTOCHROME P450 DE PLANTE ET D'UNE NADPH-CYTOCHROME P450-REDUCTASE ENDOGENE OU HETEROLOGUE ET SON UTILISATION A DES FINS DE BIOCONVERSION"**

5 La présente invention concerne une souche de levure permettant la co-expression d'une activité mono-oxygénase de cytochrome P450 microsomal de plante et d'une NADPH-cytochrome P450-réductase endogène ou hétérologue.

10 La présente invention concerne également un procédé de co-expression chez une levure d'une activité mono-oxygénase de cytochrome P450 microsomal de plante et de la NADPH-cytochrome P450-réductase endogène ou hétérologue.

La présente invention concerne également l'utilisation à des fins de bioconversion d'une souche de levure selon l'invention.

15 Plus précisément, la présente invention concerne un procédé de bioconversion destiné à la monooxygénéation spécifique, notamment à l'hydroxylation stéréospécifique, d'un composé substrat d'un cytochrome P450.

20 La présente invention concerne enfin une séquence d'ADNc codant pour le cytochrome P450 catalysant l'hydroxylase du trans-cinnamate ou ou CA4H dans les tubercules de topinambour ou dans des plantules d'Arabidopsis thaliana.

25 Les cytochromes P450 sont des protéines à activité mono-oxygénase qui constituent une des plus grandes superfamilles de gènes connue chez les eucaryotes supérieurs. Ils sont capables d'oxyder une très grande variété de substrats généralement hydrophobes en se servant de l'oxygène moléculaire dissous dans le cytoplasme, ainsi que des équivalents réducteurs fournis par la NADPH-cytochrome P450-réductase. Ces réactions sont le plus souvent caractérisées par l'insertion d'un atome 30 d'oxygène dans des liaisons C-H, C=C, N=N, soit par l'oxydation d'un hétéroatome ou encore dans des cas plus rares par une réduction de groupes nitro ou une déshalogénéation (Guengerich et Macdonald, 1990, FASEB J. 4, pp 2453-2459).

35 Les cytochromes P450 sont des protéines membranaires associés le plus souvent au réticulum endoplasmique, quelques formes étant mitochondrielles.

Leur intervention chez l'homme et les animaux dans les premières étapes de la métabolisation de substances xénobiotique telles que les médicaments ou des polluants, ainsi que leur implication dans des voies importantes du métabolisme endogène des stéroïdes membranaires et 5 hormonaux, des acides biliaires, des phéromones, de la vitamine B, des acides gras, des prostaglandines ont fait des cytochromes P450 un objet d'un vif intérêt (Nebert et Gonzales, 1987, Ann. Rev. Biochem. 56, pp 945-993).

10 Les intenses efforts de recherche se sont traduits par le développement d'un grand nombre d'outils biochimiques, immunologiques et génétiques qui ont permis l'isolement d'environ 200 séquences d'ADN (génomique ou ADNc) à ce jour.

15 Par rapport au nombre rapidement croissant des séquences connues de nombreuses isoformes de cytochromes P450 chez l'homme et chez les animaux, aucune séquence d'ADN d'un cytochrome P450 de plante avec une fonction bien définie n'a été isolée.

20 Dans le cadre de la présente invention, est revendiquée la séquence d'ADNc d'un cytochrome P450 végétal, la CA4H, qui catalyse l'hydroxylation en position 4 du trans-cinnamate. Le produit ainsi formé est le trans-coumarate.

D'une manière générale, les progrès de la recherche dans le domaine des cytochromes P450 de plantes ont été retardés en raison de leur faible teneur dans les tissus végétaux et des grandes difficultés auxquelles on se heurte lors de leur purification.

25 Les oxydations de substrats endogènes dans les plantes, catalysées par des cytochromes P450, comprennent des hydroxylations de composés aliphatiques et aromatiques, des époxydations, des déméthylation et des réarrangements intramoléculaires. Une quarantaine d'activités enzymatiques catalysées par des cytochromes P450 ont été caractérisées 30 jusqu'à présent chez les végétaux. Elles sont impliquées dans les métabolismes des phénylpropanoïdes, des terpènes, des lipides et participent aussi à la synthèse des phytoalexines, des anthocyanes, des tannins, des arômes, des hormones, des stérols membranaires, des

alcaloïdes et des cutines et suberines. Compte tenu de leur participation à la synthèse de ce grand nombre de métabolites végétaux dont certains présentent un grand intérêt industriel en tant qu'additifs alimentaires ou pigments naturels, le clonage et la surexpression coordonnée de cytochromes P450 dans un microorganisme adapté afin d'y effectuer des réactions de bioconversion sont d'un grand intérêt et très recherchés.

Il a été également rapporté la déalkylation de substances xénobiotiques (Fonné et al., 1988, Plant Sci., 55, pp 9-20). On constate un net regain d'intérêt en agronomie pour les cytochromes P450 de plantes puisqu'ils interviennent dans les premières étapes de la métabolisation de certains pesticides ou herbicides tels que le diclofop ou le chlortoluron (Zimmerlin et Durst, 1990, Phytochemistry, 29, pp 1729-1732, Fonne-Pfister et Kreuz, 1990, Phytochemistry 29, pp 2793-2797) ce qui leur confère une résistance sélective à ces produits. La maîtrise et la compréhension de leur fonction est donc de première importance pour l'industrie agronomique.

De part sa position clé dans le métabolisme secondaire de la plante, la cinnamate 4-hydroxylase à P450, qui est le point de départ commun à la synthèse d'un nombre très important de voies métaboliques, dont les produits finals ont des rôles cruciaux soit comme support structural de la cellule (lignines, phénols de la paroi), soit comme support à la protection superficielle (subérines), soit comme substance de défense de la cellule végétale contre des agents pathogènes (flavonoïdes, isoflavonoïdes, stilbènes, acides phénoliques, tannins), soit comme filtres de rayonnement UV. Outre ces fonctions vitales, un certain nombre de composés issus de ces voies métaboliques sont très recherchés dans l'industrie alimentaire comme arôme ou colorant naturels. Pour exemple, on peut citer la vanilline, dont la première étape de la biosynthèse dans la gousse de Vanilla planifolia est la transformation du trans-cinnamate en trans-coumarate. Le marché mondial de la vanilline est actuellement estimé à 5 000 tonnes/an.

Il a été décrit dans la littérature l'expression dans une levure d'un cytochrome P450 de mammifère (rat, boeuf) et de NADPH-cytochrome P450 réductase endogène ou de rat sur des vecteurs non-intégratifs.

Ni la possibilité d'expression, transport et maturation de protéines membranaires d'origine végétale dans un contexte cellulaire de levure, ni la fonctionnalité d'un couplage entre cytochrome P450 de plante et

NADPH-P450 réductase de levure n'ont pu être établies avant la présente invention.

La présente invention a pour objet une souche de levure permettant la co-expression d'une activité mono-oxygénase de cytochrome P450 de plante et d'une NADPH-cytochrome P450-réductase endogène ou hétérologue, caractérisée en ce que l'un des gènes de la NADPH-cytochrome P450-réductase ou du cytochrome P450 est intégré dans le chromosome de ladite souche, et, la souche est transformée par un vecteur portant une cassette d'expression de l'autre gène.

10 Ledit vecteur peut être un vecteur d'intégration ou non.

Lorsque ledit vecteur est un vecteur d'intégration dans le chromosome de la souche, les deux gènes se trouvent donc en fait intégrés dans le génome de la souche.

15 La présente invention a donc en particulier pour objet une souche de levure permettant la co-expression de l'activité mono-oxygénase de cytochrome P450 de plante et d'une NADPH-cytochrome P450-réductase endogène ou hétérologue, caractérisée en ce que le gène de la NADPH-cytochrome P450-réductase est intégré dans le génome chromosomique de ladite souche et la souche est transformée par un vecteur portant une cassette d'expression du gène de cytochrome P450 de plante.

20 On utilisera, de préférence, un gène de cytochrome P450 microsomal.

25 On entend ici par "microsomal" les fractions de membranes intracellulaires, notamment du réticulum endoplasmique, rugueux ou lisse, de l'appareil Golgi.

Dans un mode de réalisation particulier, ledit vecteur n'est pas un vecteur d'intégration mais un vecteur répliquatif, notamment plasmidique.

Dans la présente demande de brevet, on entend par "gène hétérologue" un gène provenant d'un organisme autre qu'une levure.

30 De préférence, le gène du cytochrome P450 est intégré dans le chromosome d'une souche. De préférence encore, les deux gènes de cytochrome P450 et respectivement de NADPH-cytochrome-P450 sont intégrés dans le génome chromosomique de la souche.

35 On cite plus particulièrement comme cytochrome P450 microsomal selon l'invention la protéine catalysant l'hydroxylase du trans-cinnamate, encore appelée protéine CA4H, notamment provenant des

tubercules de topinambour Helianthus tuberosus ou de jeunes plantules d'Arabidopsis thaliana.

De façon appropriée, ledit gène dudit cytochrome P450 est la séquence d'ADNc codant pour ledit cytochrome P450.

5 Ledit gène dudit cytochrome P450 peut être un gène hybride.

On entendu par "gène hybride" un gène pouvant résulter de recombinaisons homologues entre deux gènes de cytochrome P450 d'origines différentes, notamment d'organismes différents, ou pouvant résulter de fusions de parties de gènes de cytochrome P450 d'origines différentes, notamment d'organismes différents, l'un au moins étant toutefois d'origine végétale.

En particulier on cite la séquence d'ADNc codant pour la CA4H telle que représentée à la figure 1.

15 Dans un mode de réalisation particulier, la NADPH-cytochrome P450-réductase est la NADPH-cytochrome P450-réductase endogène de levure.

Dans un autre mode de réalisation, ledit gène de la NADPH-cytochrome P450-réductase consiste dans la séquence d'ADNc codant pour la NADPH-cytochrome P450-réductase hétérologue.

20 Le clonage de gènes de NADPH-cytochrome P450-réductase hétérologues, en particulier de plantes, a été décrit dans la demande de brevet français n° 92 04491 et la demande de brevet PCT/FR93/00367, au 2nd International Symposium on Cytochrome P450 of Microorganisms and Plants de Tokyo - 13-17 Juin 1993, dans la communication "Yeast as a 25 Cloning and Expression Host for Plant P450s and Reductases" de Denis Pompon, C. Mignotte, S. Régnier, P. Urban, G. Truan, et M. Kazmaier.

Ce procédé performant de clonage d'une séquence d'ADN codant pour une NADPH-Cytochrome P45 Réductase de plantes comporte les étapes suivantes :

30 1- On soumet une souche de levure transformée avec des plasmides d'une banque d'ADNc total de ladite plante, et ayant un phénotype de déficience en activité NADPH-Cytochrome P450 Réductase endogène, à un traitement avec un inhibiteur de cytochrome P450 d, notamment le kétoconazole, à une dose qui rend léthale l'absence d'activité NADPH-Cytochrome P450 Réductase endogène, à savoir 10 à 50 µg/ml de milieu de culture, puis

2- On récupère les clones survivants et on en extrait les plasmides permettant l'expression d'une activité NADPH-Cytochrome P450 Réductase qui correspond à la NADPH-Cytochrome P450 de ladite plante.

5 On peut citer en particulier, de façon appropriée, comme gène de NADPH-cytochrome P450-réductase, les gènes d'origine végétale, notamment les gènes de NADPH-cytochrome P450-réductase d'Arabidopsis thaliana ou de topinambour Helianthus tuberosus.

10 Les séquences d'ADNc codant pour ces gènes d'origine végétale ont été représentées dans les demandes de brevet français n°92 04491 et PCT/FR n° 93/00367. Les séquences ATR1 (Helianthus tuberosus) et ATR2 (Arabidopsis thaliana) ont été introduites dans la banque EMBL sous les références suivantes :

Pour ATR1 :

15 Accession number Y66016  
Identification number ATATR1G;

Pour ATR2 :

Accession number X66017  
Identification number ATATR2M.

20 Dans un mode de réalisation particulier, lorsque le gène de NADPH-cytochrome P450-réductase est hétérologue il est du même genre et de la même espèce que le cytochrome P450 hétérologue.

25 De manière à obtenir une intégration la plus stable possible, de préférence le(s) gène(s) de la NADPH-cytochrome P450-réductase et/ou du cytochrome P450 est (ou sont) intégré(s) dans le locus de la NADPH-cytochrome P450-réductase endogène sur drague allèle du chromosome.

Selon l'invention, la souche de levure peut être choisie notamment parmi les genres Saccharomyces, Hansenula, Kluyveromyces, Pichia et Yarrowia.

30 On cite plus particulièrement les levures du genre Saccharomyces cerevisiae.

Avantageusement, pour permettre une bonne modulation et une régulation de l'expression du cytochrome P-450 dans ledit vecteur, le gène de cytochrome P450 est mis sous le contrôle d'un promoteur inductible.

35 Dans un mode de réalisation particulier, on a utilisé le vecteur pYEDP60 décrit ci-après.

Avantageusement également, on a remplacé le promoteur naturel de la NADPH-cytochrome P450-réductase, laquelle a été mise sous le contrôle d'un promoteur hétérologue inductible.

Avantageusement encore, le gène de NADPH-cytochrome P450-réductase et le gène de cytochrome P450 sont placés sous le contrôle d'un même promoteur inductible, en particulier, le promoteur GAL10 CYC1 inductible en milieu galactose.

Dans un mode de réalisation particulier, ladite souche est obtenue à partir de la souche PES 1-3-U déposée à la Collection Nationale de Cultures de Microorganismes (CNCM) sous le n° I-1187. Cette souche a été décrite dans les demandes de brevet français n° 92 04491 et PCT/FR n° 93/00367.

Cette souche exprime, lorsqu'elle est utilisée sur un milieu contenant du galactose, un niveau de NADPH-cytochrome P450-réductase qui est 20 à 30 fois supérieur au niveau présent dans la souche parentale comportant le promoteur naturel. A l'inverse, en l'absence de galactose, le niveau de réductase présent est extrêmement faible, en fait indétectable, c'est-à-dire au moins 100 fois inférieur au niveau présent dans la souche parentale.

Des niveaux d'expression intermédiaires entre ces deux extrêmes sont possibles en utilisant des durées limitées d'induction par le galactose (0 à 12 heures).

Dans l'exemple de réalisation détaillé qui va suivre ladite souche est la souche WRCA obtenue par transformation de la souche PES 1-3-U par le vecteur pCA4H/YeDP60.

De préférence, pour obtenir les taux d'expression maximum, la souche co-exprime la NADPH-cytochrome P450-réductase et le cytochrome P450 dans un rapport molaire NADPH-cytochrome P450-réductase/cytochrome P450 optimum entre 1/3 et 1/10, notamment 1/5.

La variation des taux d'expression respectifs peut être obtenue en variant le nombre de copies des gènes respectifs et/ou en employant des promoteurs différents et plus ou moins forts et/ou en décalant le temps d'induction des promoteurs respectifs.

Dans le but d'obtenir de grandes quantités d'une molécule d'intérêt industriel par un procédé de bioconversion, le choix du microorganisme le mieux adapté pour l'expression du complexe cytochrome P450/P450 réductase est primordial. A cet égard, selon la présente invention, on

utilise la levure Saccharomyces cereviae, recombinée dans l'optique de conférer au P450 hétérologue un environnement optimal pour l'expression efficace de son activité.

Selon la présente invention, une attention particulière a été portée  
5 à la co-expression à un haut niveau de la CA4H et de la P450 réductase associée. La P450 réductase ayant un cycle catalytique plus rapide que les cytochromes P450, il est important de respecter un rapport molaire particulier essentiel au bon fonctionnement dans la levure. En effet, un rapport molaire réductase/P450 hétérologue trop bas conduit à une faible  
10 activité spécifique du fait du défaut en réductase. Un rapport molaire réductase/P450 hétérologue trop élevé conduit à la destruction d'une fraction importante du P450 du fait du fort accroissement de cycles abortifs. C'est pourquoi, afin de respecter au mieux un rapport molaire optimal réductase/P450 on a utilisé, selon l'invention, une levure  
15 recombinante chez laquelle le promoteur naturel du gène endogène de la P450 réductase a été remplacé par le promoteur inductible GAL10/CYC1. Puisque la séquence de la C4AH sur plasmide est sous contrôle du même promoteur on peut raisonnablement admettre que le rapport molaire final est donné par le nombre de copies du plasmide par rapport à la copie  
20 simple du gène de la réductase.

Selon la présente invention, on a construit une souche recombinante de levure qui assure un niveau optimal pour l'expression du premier cytochrome P450 de plante à fonction connue. Plus précisément, pour un niveau d'expression comparable à celui trouvé dans la littérature  
25 de 100 picomoles par mg de protéines microsomalement, l'activité spécifique est de l'ordre de 400 min<sup>-1</sup>, la valeur la plus élevée jamais mesurée pour un cytochrome P450 microsomal. Cette activité reste de surcroit stable dans le temps. En particulier, selon la présente invention on décrit donc une souche recombinante de levure qui sur les critères de productivité est tout  
30 à fait adaptée à la bioconversion du trans-cinnamate en tr-coumarate par la CA4H de topinambour.

La présente invention fournit donc également un procédé de co-expression chez une levure de l'activité mono-oxygénase de cytochrome P450 microsomal de plante, caractérisé en ce qu'on cultive dans un milieu  
35 de culture approprié une souche selon l'invention.

La présente invention a également pour objet l'utilisation à des fins de bioconversion d'une souche de levure selon l'invention.

La présente invention a, en particulier, pour objet un procédé de bioconversion destiné à la monoxydation spécifique d'un composé substrat d'un cytochrome P450, caractérisé en ce qu'on convertit un milieu contenant ledit composé ou un précurseur avec l'une des souches selon 5 l'invention exprimant l'activité monoxygénase dudit cytochrome P450 et en ce qu'on récupère le produit monoxygéné.

De préférence, on utilise comme milieu de conversion le milieu de culture de la souche. Néanmoins, il est possible de prévoir, lorsque la masse de levure initialement cultivée est suffisante, d'effectuer la 10 conversion dans un milieu qui n'est pas un milieu de culture.

En général, le substrat est contenu dans le milieu, il rentre dans les cellules où il est convertit, puis est relargué dans le milieu. Toutefois, dans certains cas, le milieu peut contenir uniquement un précurseur du substrat, le substrat n'apparaissant qu'à l'intérieur après transformation 15 du précurseur.

La mono-oxydation peut être, par exemple, une hydroxylation stéréospécifique, notamment lorsque le cytochrome P450 est la CA4H, auquel cas le composé substrat est le trans-cinnamate et on récupère le trans-coumarate.

20 Enfin, la présente invention a aussi pour objet les séquences d'ADNc codant respectivement pour le cytochrome P450 CA4H d'Arabidopsis thaliana et le cytochrome P450 CA4H d'Helianthus tuberosus, notamment les séquences d'ADNc telles que représentées aux figures 1 et 12 ou les séquences d'ADNc s'hybridant dans des conditions faiblement 25 stringentes à 50°C et/ou présentant au moins 60 % d'homologie avec l'une des séquences précédemment décrites, ou les mêmes séquences reformatées ne comprenant que la phase de lecture ouverte.

D'autres caractéristiques et avantages de la présente invention apparaîtront à la lumière de la description détaillée du(des) mode(s) de 30 réalisation qui va suivre, illustrée par les dessins annexés sur lesquels :

- la figure 1 représente l'ADNc du gène de cytochrome P450 de topinambour Helianthus tuberosus CA4H,

- la figure 2 représente le schéma de clonage de l'ADNc reformattede ne comprenant que la phase de lecture ouverte de la CA4H de topinambour 35 dans le vecteur de lecture pYED P60,

- la figure 3 représente, schématisée, la souche de lecture WRCA surexprimant simultanément en milieu galactosé une CA4H exogène et la NADPH-cytochrome P450-réductase endogène (ci-après abrégé par "P450-réductase"),
  - 5 - la figure 4 représente le spectre de différence d'absorption en présence de monoxyde de carbone d'une fraction microsomale de souche WRCA,
  - la figure 5 représente le spectre de perturbation de type I suite à l'ajout de l'acide trans-cinnamique aux microsomes à partir de la culture 10 induite de la souche WRCA,
  - la figure 6 représente un chromatogramme de détection du trans-cinnamate après conversion du trans-cinnamate par une culture de WRCA en milieu galactosé,
  - la figure 7 représente la variation de l'amplitude d'absorption 15 dans un spectre de perturbation de type I en fonction du trans-cinnamate ajouté en quantités croissantes à des microsomes oxydés issus d'une culture induite de la souche WRCA,
  - la figure 8 représente l'efficacité de couplage entre la NADPH P450-réductase de levure et la CA4H de topinambour dans les microsomes 20 de la souche WRCA,
  - la figure 9 montre une représentation selon Lineweaver-Burk donnant l'inverse des activités CA4H mesurées en fonction de l'inverse de la concentration de trans-cinnamate ajouté permettant la détermination 25 de la vitesse maximale de conversion de la CA4H dans les microsomes de levure ainsi que le Km,
  - la figure 10 représente la cinétique de formation de p-coumarate sur des microsomes de WRCA,
  - la figure 11 représente la cinétique de formation de p-coumarate à partir du trans-cinnamate sur cellules entières contenant la CA4H de topinambour,
  - la figure 12 représente l'ADNc complet du gène de la CA4H d'Arabidopsis thaliana,
  - les figures 13A, 13B et 13C représentent respectivement les 3 étapes (A, B, C) nécessaires à la construction du vecteur intégratif 30 pYEDP110. A la figure 13A est illustrée l'amplification par PCR des régions 5' et 3' non-codantes qui bordent la phase ouverte de lecture du locus génomique de la NADPH cytochrome P450 réductase de levure. Sont

illustrés également les sites de restriction créées en bordure des fragments amplifiés. En figure 13B est montré le remplacement du terminateur PGK par la région 3' non-codante d'un gène de la NADPH cytochrome P450 réductase de la levure dans le vecteur pYEDP51. En 5 figure 13C est montré le remplacement de l'origine de réPLICATION 2 microns de levure par la région 5' non-codante du gène de la NADPH cytochrome P450 réductase de la levure dans le vecteur pYEDP100. Le vecteur intégratif ainsi obtenu est nommé "pYEDP110",

10 - la figure 14 représente la structure physique du locus Yred dans les différentes souches,

15 - la figure 15 représente un tableau récapitulatif dans lequel sont rapportées les résistances des différentes souches au kéroconazole, les activités NADPH cytochrome P450 réductase mesurées (en nmoles cyte réduit/min/mg de protéines microsomales) sur des préparations de microsomes, ainsi que l'aptitude à effectuer la conversion du tr-cinnamate en coumarate. L'appréciation +++ indique que la réaction de bioconversion est complète en 30 minutes,

20 - les figures 16A à 16D représentent des séparations en HPLC des métabolites obtenues après l'incubation des souches C11, C21, C100 et 21/21 en présence de 10 µM de tr-cinnamate. Le paracétamol présent sur les chromatogrammes est ajouté dans les échantillons analysés comme contrôle interne de l'efficacité d'extraction.

I) ISOLEMENT d'ADNc CODANT POUR DES CYTOCHROMES P450 DU TYPE COUMARATE 4-HYDROXYLASE (E.C. 1.14.13.1) D'ORIGINE VEGETALE

1.1) Isolement de l'ADNc du Cytochrome P450 catalysant l'hydroxylation du tr-cinnamate dans les tubercules de topinambour (CA4H = cinnamate 4-hydroxylase.E.C.1.14.13.1).

La procédure de clonage de la CA4H met en oeuvre des méthodes classiques de la biologie moléculaire connues de l'homme de l'art. Le protocole de purification, ainsi que l'obtention d'un anticorps anti-CA4H spécifique à l'aide de la protéine purifiée, est décrit dans la littérature scientifique (Gabriac et al, Archives of Biochemistry and Biophysics, 1991, Vol 288, pp 302-309) et n'est pas repris en détail ici. Brièvement, des tranches de tubercules de topinambour, incubés dans un milieu contenant du manganèse pour induire la synthèse de l'activité enzymatique de la CA4H, constituent le matériel de départ pour la préparation de la fraction microsomale. Il suit une première étape d'enrichissement en CA4H par une partition de phases en triton X-114, et deux étapes de chromatographie sur DEAE-Trisacryl et sur Hydroxylapatite. La protéine ainsi purifiée, qui montre un poids moléculaire apparent de 57KD en gel SDS-Acrylamide, a été utilisé pour la fabrication d'anticorps polyclonaux. Ces anticorps réagissent de manière sélective avec un polypeptide de 57 KD en Western blot et inhibent aussi fortement l'activité CA4H dans des microsomes de différentes espèces végétales. Leur utilisation pour cibler une banque d'ADNc de topinambour dans le phage lambda gt11, obtenue à partir de tubercules induits pour la surexpression de la CA4H, a permis d'isoler un fragment d'ADNc de 1130 bp présentant des séquences caractéristiques de cytochromes P450 bactériens, fongiques ou animaux. Ce fragment a été ensuite utilisé comme sonde pour cibler une deuxième banque d'ADNc de topinambour dans le phage lambda gt10 construite par amorçage à l'oligonucléotide. Ceci a permis d'isoler un clone de 1608 bp qui présente toutes les séquences

caractéristiques d'un P450 et la séquence complète est montré en figure 1. Cet ADNc peut être identifié comme étant celui de la CA4H de topinambour pour les raisons suivantes : a) les pH isoélectriques de la protéine purifiée et celui calculé du polypeptide issu de l'ADNc, sont tous deux voisins de pH 9,0 b) l'anticorps anti-CA4H reconnaît dans la banque d'expression un polypeptide de fusion présentant des séquences caractéristiques de P450 c) la partie 5' terminale du polypeptide déduit de l'ADNc isolé par criblage immunologique avec un anticorps spécifique anti-CA4H est totalement identique à la séquence N-terminale de la CA4H purifiée.

Nous disposons donc de la première séquence nucléotidique codant pour un cytochrome P450 d'origine végétale de fonction connue, déterminée à ce jour.

1.2) Isolement de l'ADNc du cytochrome P450 catalysant l'hydroxylation du tr-cinnamate dans des jeunes plantules d'Arabidopsis thaliana.

La faisabilité de l'isolation d'un ADNc codant pour la CA4H dans une banque d'ADNc totale d'une autre espèce végétale, et plus particulièrement dans une banque d'ADNc totale faite à partir de jeunes plantules d'Arabidopsis thaliana, en utilisant la région codante de la CA4H topinambour comme sonde pour une cross-hybridation inter-espèces, se fonde sur deux hypothèses:

a) les ADNc codant pour une protéine à fonction identique sont suffisamment conservés dans le règne végétal pour permettre leur détection par cross-hybridation inter-espèces à stringence réduite;

b) la CA4H étant un cytochrome P450 ubiquitaire dans le règne végétal, dont les produits finals de métabolisation ont des rôles cruciaux pour la plante entière (support structural des cellules, protection superficielle, défense contre les pathogènes, protection contre les rayonnements UV), les ADNc codant pour cette enzyme doivent être enrichis dans une banque d'ADNc faite à partir de jeunes plantules en pleine phase de croissance.

Comme matériel de départ pour le clonage inter-espèce par cross-hybridation, on a choisi une banque d'ADNc d'Arabidopsis thaliana faite à partir de jeunes plantules au stade deux feuilles, bien connue e l'homme de métier, et publiée dans la littérature scientifique (MINET et al., 5 1992, Plant 2, pp 417-422). La complexité de cette banque a été estimée à 2,5 10<sup>6</sup> de clones indépendants.

100 000 clones du stock original glycérolé de cette banque d'ADNc ont été étalés sur 20 boites petri (12 cm x 12 cm) LB/ampicilline à raison de 500 clones/boite. Après 8 heures d'incubation à 37°C, les colonies bactériennes sont transférées sur membrane Hybond N (Amersham) selon les méthodes classiques préconisées par le fabricant. La préhybridation, ainsi que l'hybridation ont été conduits en conditions standard bien connues de l'homme du métier, mais à une température de 55°C pour tenir compte de l'utilisation d'une sonde hétérologue. 200 ng de l'ADNc de la 15 CA4H topinambour décrit sous 1.1 ont été marqués au <sup>32</sup>P en se servant du random priming kit fourni par Biolabs et 10<sup>8</sup> cpm sont utilisés lors des hybridations. 12 clones montrant un signal d'hybridation lors du premier tour de criblage ont été ensuite soumis à 2 cycles d'amplification, résultant en deux clones indépendants, pATCA4H2 et pATCA4H9, à très fort signal 20 d'hybridation. Le clone pATCA4H2 possède un insert végétal d'environ 1,8 kb, compatible avec un ADNc complet codant pour un cytochrome P450. Cet insert a été ensuite sous-cloné dans le vecteur de séquence pKSII fourni par Stratagène. La séquence entière de l'insert a été lue sur les deux brins par la création de délétions progressives unilatérales à l'exonucléase 25 III en suivant les conditions standard décrites dans la littérature scientifique. Pour le séquençage de l'ADN double-brin, le T7 polymérase Sequencing Kit fourni par Pharmacia a été utilisé selon les conditions préconisées. La séquence de 1 735 bp contient une phase ouverte de lecture de 505 acides aminés, qui présente 85,9% d'homologie avec la 30 séquence de la CA4H de topinambour. On a ainsi identifié la séquence d'ADNc codant pour la cinnamate 4-hydroxylase à cytochrome P450 d'une source végétale différente par cross-hybridation inter-espèces. La séquence entière est montrée en figure 12.

II) CLONAGE DANS DES VECTEURS D'EXPRESSION REPLICATIFS OU INTEGRATIFS DE SACCHAROMYCES CEREVIAE D'ADN CODANT POUR DES CYTOCHROMES P450 VEGETAUX ET DE CYTOCHROME P450 REDUCTASES VEGETAUX

5

Afin de pouvoir coexprimer de façon très efficace l'activité de cytochrome P450 végétaux chez *Saccharomyces cerevisiae*, les outils suivants ont été mis en oeuvre :

10 - la souche haploïde de *Saccharomyces cerevisiae* PES 1-3U. Cette souche est totalement isogénique à la souche parentale W 303.1B, à l'exception du promoteur naturel du gène endogène de la P450 réductase, qui a été avantageusement remplacé par le promoteur inductible GAL10/CYC1. De cette façon, la souche PES 1-3U surproduit sa propre P450 réductase lorsqu'elle est cultivée en milieu galactosé. Son obtention et sa

15 description détaillée fait l'objet d'une demande de brevet PCT/FR 91 08884 et est également publiée dans la littérature scientifique (TRUAN et al., 1993, Gene 125, pp. 49-55);

20 - le vecteur réplicatif chez *Saccharomyces cerevisiae* pYEDP 60. Ce vecteur permet l'expression sous le contrôle du promoteur inductible GAL10-CYC1 d'ADN hétérologues dans la levure. La construction de pYEDP 60 a été décrite dans la littérature scientifique (URBAN, CULLINET, POMPOM, 1990, Biochimie, 72, pp. 463-472) et une description schématique est montrée en figure 3;

25 - le vecteur intégratif chez *Saccharomyces cerevisiae* pYEDP 100. Sa construction se fait en deux étapes qui seront reprises plus en détail ici :

Etape 1 : l'amplification par PCR des régions 5' et 3' flanquantes du gène de la NADPH cytochrome P450 réductase de levure, qui serviront de bornes de recombinaison homologue lors de l'intégration ciblée.

30 Comme matrice, on utilise le plasmide pGP1 qui est caractérisé par l'insertion d'un fragment Hind III d'environ 9 kbp de l'ADN génomique de levure contenant le gène de la NADPH cytochrome P450 réductase de levure, dans le vecteur pUC 19. Les oligonucléotides servant d'amorces pour l'amplification par PCR ont été conçus de façon à ce que les fragments d'ADN amplifiés soient bordés par des sites de restrictions utiles 35 lors de futres sous-clonages. Pour plus d'aisance, les fragments de PCR à bouts francs sont d'abord sous-clonés dans le vecteur pUC19, avant de récupérer les fragments d'ADN aux bouts compatibles par digestion

enzymatique de l'ADN circulaire. Plus précisément, on récupère la partie 5' (638 bp en amont de l'ATG d'initiation) non codante sous forme de fragment Bgl II-Hind III, la partie 3' non-codante (410 bp en aval du TAA contenant le terminateur YRed) sous forme de fragment EcoRI-Pvu II.

5 L'étape 1 est schématiquement illustrée en figure 13A.

Etape 2 : Sous-clonage du fragment EcoRI-PvuII dans le vecteur d'expression pYEDP51.

Le vecteur pYEDP51 (figure 13B) est un précurseur du vecteur publié pYEDP60, auquel manque le marqueur génétique ADE2. La double digestion par EcoRI et PvuII résulte en un fragment d'ADN linéaire de XXXX bp correspondant au vecteur pYEDP51 auquel ont été enlevés une partie des sites uniques de clonage (SmaI et SacI), le terminateur PGK ainsi qu'une partie des séquences de pUC entre le terminateur et le site PvuII. Après purification sur gel d'agarose, le vecteur est recircularisé par ligation en présence du fragment EcoRI-PvuII. Le vecteur pYEDP100 ainsi construit est caractérisé en ce que le terminateur PGK a été remplacé par 410 bp de la région 3' non-codante du gène de la NADPH cytochrome P450 réductase de levure contenant son terminateur.

20 Etape 3 : Sous-clonage du fragment Bgl II-HindIII dans le vecteur d'expression pYEDP 100.

La double digestion par Bgl II et HindIII du vecteur pYEDP100 résulte en trois fragments linéaires de 4 561 respectivement M bp. Le fragment de 4 561 bp correspond au vecteur pYEDP100, hormis l'origine de réPLICATION autonome de la levure, qui a été excisé lors de la double digestion. Ce 25 fragment linéaire est recircularisé par ligation en présence du fragment Bgl II-HindIII, comprenant 638 bp de la région non-codante du gène de la NADPH cytochrome P450 réductase en amont du promoteur. Le vecteur pYEDP110 de 5 200 bp ainsi construit (voir figure 13C) peut être propagé chez E. coli grâce à l'origine de réPLICATION bactérien, par contre il ne 30 peut plus se répliquer chez la levure. De plus, lors d'une digestion NotI (deux sites créés par PCR) du vecteur pYEDP110 libère un fragment d'ADN bordé de régions 5' et 3' non-codantes du gène de la NADPH cytochrome P450 réductase de levure, qui serviront de bornes de recombinaison pour 35 recombinaison homologue. Entre ces deux régions d'homologie se trouvent le marqueur génétique URA 3 et le promoteur GAL10/CYC1 sivi de sites de restriction uniques, utiles lors du clonage des séquences hétérologues à exprimer.

Les 4 ADNc végétaux pris en considération pour le sous-clonage dans les vecteurs d'expression de levure pYEDP60 et pYEDP110 en vue de la coexpression d'une activité cytochrome P450 végétale dans *Saccharomyces cerevisiae* sont :

5        - CA4H de topinambour  
          - CA4H d'Arabidopsis thaliana

La séquence entière de ces deux ADNc est donnée dans les figures 1 et 12 :

- ATR1
- ATR2

10      Ce sont deux ADNc codant pour deux NADPH cytochrome P450 réductase isolés par complémentation fonctionnelle dans une banque d'Arabidopsis thaliana bien décrite dans la littérature scientifique (MINET et al., 1992, Plant J. 2, pp. 417-422). Leur obtention et leur caractérisation sont décrites dans la demande de brevet en France n° 92 04491.

15      Le sous-clonage des phases de lectures ouvertes, à l'exception des séquences non-codantes, afin de donner le meilleur environnement pour la transcription efficace, se faisant de manière identique pour les deux vecteurs en question, on ne reprend ici en détail que le clonage de la CA411 de topinambour dans le vecteur pYEDP60, illustré en figure 2.

20      La méthode de clonage schématisée en figure 2 fait appel à une étape d'amplification par PCR, qui par un choix judicieux des oligonucléotides servant d'amorces pour la PCR, résulte en l'amplification sélective de la région codante de la CA4H, débarrasse l'ADNc amplifié des bordures 5' et 3' non-codantes et introduit également des sites de restriction convenables pour la suite du sous-clonage. Après un passage du fragment d'ADNc amplifié possédant des bouts francs dans pUC 19 digéré par SmaI, le plasmide pCA4H ainsi obtenu est ensuite digéré par des enzymes de restriction adéquats flanquant le fragment d'ADNc, qui ont été préalablement introduits par PCR. Le vecteur de levure pYEDP60 est ensuite digéré au niveau du site de multiclorage situé entre le promoteur GAL10/CYC1 et le terminateur PGK de façon à générer un vecteur linéaire comprenant des bouts compatibles avec le fragment d'ADNc contenant la région codante de la CA4H. Puis on procède à la recircularisation dans un milieu réaction-

nel comprenant le vecteur linéarisé, le fragment d'ADNc contenant la CA4H et de la ligase. Le vecteur recirculisé ainsi obtenu contient les séquences nécessaires à la propagation chez *E. coli* (origine de replication et le gène bla conférant la résistance à l'ampicilline chez *E. coli*), à la propagation chez *S. cer* (origine de replication chez *S. cer* et les gènes URA3 et ADE2 permettant de complémenter les auxotrophies de la souche hôte), ainsi que les signaux de régulation permettant l'induction de l'expression de l'ADNc codant pour la CA4H en milieu galactosé (figure 2). Toutes les méthodes utilisées afin de réaliser ce clonage sont des méthodes standard et bien décrites dans des livres de référence (Sambrook, Fritsch and Maniatis, 1989, Molecular Cloning, 2 éd., CSH Laboratory Press). La construction du vecteur de levure pYEDP 60 a été décrit dans la littérature (Urban, Cullin et Pompon, 1990, Biochimie, 72, pp 463-472).

Les vecteurs ainsi obtenus sont :

- pYEDP60/CA4H (CA4H topinambour)
- pYEDP60/CA4HAT (CA4H d'Arabidopsis)
- pYEDP60/ATR1
- pYEDP60/ATR2
- pYEDP110/CA4H
- pYEDP110/CA4HAT
- pYEDP110/ATR1
- pYEDP110/ATR2

III) CONSTRUCTION D'UN ENSEMBLE DE SOUCHES EXPRIMANT EXCLUSIVEMENT LES ACTIVITES CA4H OU NADPH CYTOCHROME P450 REDUCTASE D'ORIGINE VEGETALE

Les vecteurs pYEDP110/CA4H, pYEDP110/ATR1, pYEDP110/ATR2 sont soumis à une digestion exhaustive par NotI. Le mélange de digestion est ensuite précipité et utilisé sans aucun traitement pour la transformation de la souche W303. 1B. En effet, seul le fragment portant les séquences hétérologues derrière le promoteur GAL10/CYC1 peut

conférer à la souche transformée un phénotype Ura 3+ après intégration de la cassette d'expression dans le locus de la NADPH cytochrome P450 réductase de levure en se servant des bordures 5' et 3' non-codantes pour la recombinaison homologue. La persistance d'une petite fraction de vecteur non-digérée non décelable en gel d'agarose ne peut pas conduire à un phénotype ura+, le vecteur pYEDP110 n'étant plus capable de se propager chez la levure en l'absence de l'origine 2  $\mu$  (voir figure 13C). Ainsi, on procède par recombinaison homologue au remplacement du gène endogène de la NADPH cytochrome P450 réductase de levure par la cassette d'expression portant le gène hétérologue d'intérêt.

Le mélange de transformation est étalé sur des boîtes ura-, les clones capables de pousser en l'absence d'uracile sont ensuite analysés par southerm-blot génomique pour vérifier s'il y a bien eu l'intégration des séquences hétérologues au bon endroit. Un deuxième contrôle de l'événement d'intégration consiste dans la mesure de la résistance des souches recombinantes au kéroconazole, un antifongique inhibiteur du cytochrome P450 C14-déméthylase de la levure. En effet, il a été montré que la perte du gène de la NADPH cytochrome P450 réductase induit le phénotype d'hypersensibilité au kéroconazole (Sutter et Loper, 1989, Biochem. Biophys. Res. Comm., 160, pp. 1257-1266). Le tableau 1 illustre bien que, lorsque le gène de la CA4H de topinambour a été intégré en lieu et place de la NADPH cytochrome P450 réductase de levure, la souche WCA41 devient hypersensible au kéroconazole. Par contre, les souches WAT11 et WAT21, ayant acquis les ADNc d'ATR1 (WAT11) ou d'ATR2 (WAT21) par recombinaison homologue sont résistants au kéroconazole, mais à un degré moindre que la souche parentale W303. 1B, ce qui reflète le couplage moins efficace des NADPH cytochrome P450 réductases végétales avec le cytochrome P450 de la levure par rapport à la NADPH cytochrome p450 réductase endogène. Ce phénotype de résistance au kéroconazole est induit en milieu galactosé, ce qui prouve bien que la résistance est due à l'activité de la NADPH cytochrome P450 réductase hétérologue sous contrôle du promoteur GAL10/CYC1.

En résumé, en utilisant les vecteurs intégratifs pYEDP110/CA4H, pYEDP110/ATR1, pYEDP/ATR2 pour transformer la souche W303.1B, on a obtenu les souches suivantes :

WAT11 :

Cette souche est caractérisée en ce que le gène de la NADPH cytochrome P450 réductase de levure est remplacé par celui d'Arabidopsis, qui est sous 5 contrôle du promoteur GAL10/CYC1. Ainsi cette souche surexprime l'activité NADPH cytochrome P450 réductase AT1 lorsqu'elle est cultivée en milieu galactosé.

WAT21 :

Cette souche est caractérisée en ce que le gène de la NADPH cytochrome 10 P450 réductase de levure est remplacé par celui d'Arabidopsis, qui est sous contrôle du promoteur GAL10/CYC1. Ainsi cette souche surexprime l'activité NADPH cytochrome P450 réductase ATR2 lorsqu'elle est cultivée en milieu galactosé.

WCA41 :

15 Cette souche est caractérisée en ce que le gène de la NADPH cytochrome P450 réductase de levure est remplacé par celui de la CA4H de topinambour, qui est sous contrôle du promoteur GAL10/CYC1. Ainsi cette souche surexprime la CA4H lorsqu'elle est cultivée en milieu galactosé, mais aucune activité n'est mesurable en l'absence de NADPH cytochrome 20 P450 réductase susceptible de transférer les équivalents réducteurs au cytochrome P450, nécessaires pour son activité.

Une illustration schématique du locus de la NADPH cytochrome P450 réductase de la souche parentale, ainsi que des souches recombinantes construites, est donnée en figure 14.

25

3.1) Transformation des souches WAT21, WCA41, PES 1-3U :

a) La souche WAT11 est transformée par le vecteur pYEDP110/CA4H de façon à surexprimer simultanément en milieu galactosé la CA4H de topinambour sur plasmide et la NADPH cytochrome 30 P450 réductase d'Arabidopsis ATR1 pour constituer un complexe hydroxylant actif d'origine entièrement végétale. La maintenance du plasmide réplicatif se fait par sélection du phénotype Ura<sup>+</sup> ou Ade<sup>+</sup>, apportés par le plasmide réplicatif. Cette souche est nommée ultérieurement WAT11/CA4H. La transformation est effectuée selon une 35 méthode standard au chlorure de lithium (POMPON, 1988, Eur. J. Biochem., 177, pp. 285-293).

b) La souche WAT21 est transformée par le vecteur pYEDP110/CA4H de façon à surexprimer simultanément en milieu galactosé la CA4H de topinambour sur plasmide et la NADPH cytochrome P450 réductase d'Arabidopsis ATR2 pour constituer un complexe hydroxylant actif d'origine entièrement végétale. La maintenance du plasmide réplicatif se fait par sélection du phénotype Ura<sup>+</sup> ou Ade<sup>+</sup>, apportés par le plasmide réplicatif. Cette souche est nommée ultérieurement WAT21/CA4H. La transformation est effectuée selon une méthode standard au chlorure de lithium (POMPON, 1988, Eur. J. Biochem., 10 177, pp. 285-293).

c) La souche PES 1-3U est transformée par le vecteur pYEDP110/CA4H de façon à surexprimer simultanément en milieu galactosé la CA4H de topinambour sur plasmide et la NADPH cytochrome P450 réductase endogène pour constituer un complexe hydroxylant actif d'origine mixte. Cette souche est nommée ultérieurement "WRCA".

d) La souche WCA41 est transformée par le vecteur pYEDP110/ATR1 de façon à surexprimer simultanément en milieu galactosé la CA4H de topinambour intégrée et la NADPH cytochrome P450 réductase d'Arabidopsis ATR1 sur plasmide pour constituer un complexe hydroxylant actif d'origine entièrement végétale. La maintenance du plasmide réplicatif se fait par sélection du phénotype Ura<sup>+</sup> ou Ade<sup>+</sup>, apportés par le plasmide réplicatif. Cette souche est nommée ultérieurement "WCA41/ATR1". La transformation est effectuée selon une méthode standard au chlorure de lithium (POMPON, 1988, Eur. J. Biochem., 20 177, pp. 285-293).

e) La souche WCA41 est transformée par le vecteur pYEDP110/ATR1 de façon à surexprimer simultanément en milieu galactosé la CA4H de topinambour intégrée et la NADPH cytochrome P450 réductase d'Arabidopsis ATR2 sur plasmide pour constituer un complexe hydroxylant actif d'origine entièrement végétale. La maintenance du plasmide réplicatif se fait par sélection du phénotype Ura<sup>+</sup> ou Ade<sup>+</sup>, apportés par le plasmide réplicatif. Cette souche est nommée ultérieurement "WCA41/ATR2". La transformation est effectuée selon une méthode standard au chrorure de lithium (POMPON, 1988, Eur. J. Biochem., 30 177, pp. 285-293).

35 177, pp. 285-293).

IV) CONSTRUCTION DE SOUCHES DE LEVURES DIPLOIDES COEXPRIMANT DE MANIERE STABLE LES ACTIVITES CYTOCHROME P450 HETEROLOGUES ET NADPH CYTOCHROME P450 REDUCTASES HOMOLOGUES OU HETEROLOGUES.

5

Les souches de levures transformées décrites ci-dessus doivent être maintenues en milieu sélectif, afin d'assurer la persistance du plasmide qui apporte l'un des composés du complexe hydroxylant actif. Avantageusement, on s'affrancit de cette pression de sélection par la construction de souches ayant intégré de manière stable une copie de chacun des ADNc codant pour la CA4H, notamment de topinambour et une NADPH cytochrome P450 réductase notamment d'Arabidopsis. De tels souches sont facilement obtenues par croisement de deux souches haploïdes de signe sexuel opposé.

10 15 Comme leur souche parentale, les souches WAT11, WAT21 et WCA41 sont de signe sexuel (mating type) a. Grâce à la technique du plasmide Ho appliquée selon la méthode publiée (Methods in Enzymology, vol. 194, pp. 132-146), le signe sexuel est échangé en a. Les souches WAT11a, WAT21a, WCA41a sont donc totalement isogéniques (à l'exception du locus sexuel) aux souches WAT11, WAT21 et WCA41.

20 25 Le test de diploïdie des croisements WAT11a x WCA41a et WAT21 x WCA41a se fait selon les méthodes classiques de génie génétique de levure bien connues de l'homme du métier. Comme contrôles internes lors des mesures de bioconversion mettant en oeuvre l'activité CA4H sont également inclus les croisements WAT11 x WAT11(11/11), WAT21 x WAT21 (21/21) et WCA x W100 (intégration de la cassette d'expression vide, voir figure 15). Aucune activité CA4H ne doit être décelable dans ces souches.

30 Les souches diploïdes ainsi obtenues, nommées C11 (WAT11 x WCA41) et C21 (WAT21 x WCA41) totalement isogéniques sur les allèles à l'exception des loci de la NADPH cytochrome P450 réductase de levure qui portent respectivement une copie du gène de NADPH cytochrome P450 réductase d'Arabidopsis et une copie du gène de CA4H de topinambour.

V) CARACTERISATION DE L'ACTIVITE CA4H VEGETALE DANS DIFFERENTES SOUCHES DE LEVURE EN PRESENCE DE NADPH CYTOCHROME P450 REDUCTASES VEGETALES ENDOGENES.

5

La CA4H, cytochrome P450 ubiquitaire dans le règne végétal, catalyse l'hydroxylation du cinnamate en position 4 pour donner du coumarate. En vue de l'application de souches de levures recombinantes comme biocatalyseurs afin d'y effectuer des réactions chimiques précises,

10 par la voie de la biotechnologie, il est indispensable de prouver, dans un premier temps, que le substrat ainsi que le produit formé sont stables dans le milieu réactionnel. Avantageusement, le substrat rentre sans aucune restriction apparente dans le biocatalyseur et le produit de la réaction au Cytochrome P450 ne s'accumule pas dans la cellule mais est exporté dans le milieu où l'on peut le récupérer facilement. Avantageusement encore, on s'assure que ni substrat ni produit ne sont toxiques pour la cellule à des concentrations compatibles avec un procédé de bioconversion.

15 A cette fin, on réalise des cultures de C11 et C21 en milieu YPGAL, WRCA, WAT11/CA4H, WAT21/CA4H, WCA41/ATR1 et WCA41/ATR2 en milieu minimum galactosé jusqu'à OD=3 (fin de phase de croissance exponentielle); on ajoute 100 µM tr-cinnamate, puis on incube pendant 30 minutes à 30°C sous agitation modérée.

20 Le procédé d'extraction et la séparation par HPLC sont décrits en détail au paragraphe 6.4) ci-après.

25 Au tableau 1 sont indiquées les mesures de la bioconversion. L'appréciation +++ indique que la bioconversion a été complète, plus aucune trace de cinnamate résiduel peut être décelé. L'ensemble des spectrogrammes montrés en figure 7 montre bien que la conversion cinnamate → coumarate est due à la présence de la CA4H, puisque les souches contrôle 11/11, 21/21 et C100 ne montrent aucune apparition de pic correspondant au coumarate. Egalement, il est clair qu'en l'absence d'activité CA4H, le cinnamate est stable dans le milieu réactionnel.

30 Une caractérisation plus fine de la CA4H végétale exprimée chez la levure est donnée avec l'exemple de la souche WRCA.

VI) Caractérisation de l'activité enzymatique de la CA4H chez S. cer.

6.1) Description de l'environnement génétique de la souche WRCA

5 En figure 3 est schématisée la souche de levure WRCA qui a été construite de façon à surexprimer simultanément en milieu gala c toisé la CA4H exogène et la P450 Réductase endogène. La souche WRCA est obtenue par transformation de la souche PES 1-3U par le plasmide pCA4H/YeDP60 décrit ci-dessus. La souche PES 1-3U, qui porte comme mutations connues Ura3, Ade2, His1, et Leu2, a été transformée selon une méthode standard au chlorure de lithium (Pompon, 1988, Eur. J. Biochem., 177, pp 285-293), suivie d'une sélection pour la restauration du phénotype Ade+ qui est apporté en présence du plasmide. La souche PES 1-3U, dont la description détaillée fait objet d'une demande de brevet en France n° 91 08884, a été déposée auprès de la Collection Nationale des Cultures et de Microorganismes le 17 mars 1992, sous le numéro de dépôt 10 I-1187. Cette souche haploïde (mating type alpha) est complètement isogénique à la souche de laboratoire W303.1B, sauf la région promotrice précédant la phase codante de la P450 Réductase endogène, qui est modifiée par recombinaison homologue de façon à remplacer le promoteur naturel de la P450 Réductase par le promoteur inducible GAL10-CYC1.

15

20

25

6.2 Détermination de la concentration en Cytochrome P450 dans la fraction microsomale de la souche WRCA

On réalise une préculture (150 ml) de la souche 30 WRCA en milieu SW5 à 28°C sous agitation modérée (100 rpm) jusqu'à une densité cellulaire de 3 OD, puis on ajoute 1 vol/vol de milieu YPGAL (induction de la CA4H et de la P450 Réductase) et on continue la culture jusqu'à une densité cellulaire de 10 OD. On arrête la culture par 35 centrifugation des cellules puis on procède à la préparation des microsomes selon un procédé standard impliquant

la casse mécanique des cellules (Cullin et Pompon, 1988, Gene, 65, pp 203-217). On obtient ainsi une solution homogène de microsomes de 2,8 ml, conservée à -80°C sous forme d'aliquots de 100 microlitres, et qui sert de solution stock pour toutes les expériences décrites par la suite. Pour mesurer la concentration totale en protéines dans cette solution stock de microsomes on se sert de la méthode de Pierce avec la serumalbumine comme standard. La concentration globale en Cytochrome P450 contenu dans ces microsomes est mesurée par spectrophotométrie différentielle selon la méthode décrite par Omura et Sato (1964, J. Biol. Chem. 239, pp 2379-2387) qui met en évidence la formation du pic caractéristique d'absorption autour de 450 nm du Cytochrome P450 réduit après fixation d'une molécule de monoxide de carbone sur l'atome fer du chromophore, par rapport à la forme réduite du cytochrome P450 en absence de monoxide de carbone. Plus précisément, on répartit dans deux cuvettes spectrophotométriques des quantités égales de la solution stock de microsomes (environ 2 mg de protéines totales) diluée 10 fois dans un tampon composé de 50 mM Tris-HCl pH 7,4 et 1 mM EDTA et à laquelle on a ajouté auparavant quelques graines de dithionite de sodium afin de réduire totalement les cytochromes P450 présents dans les microsomes et de consommer tout oxygène libre dissous dans la solution. Les deux cuvettes contenant des quantités égales de microsomes réduits servent à faire la ligne de base entre 400 et 500 nm. On fait ensuite barboter une dizaine de bulles de monoxide de carbone dans la cuvette d'essai, ce qui mène à la formation du pic d'absorption vers 450 nm dû à la fixation du monoxide de carbone à l'ion fer du groupe hème présent dans le cytochrome P450, par rapport aux microsomes réduits dans la cuve témoin. En se servant du coefficient d'absorption qui est de  $91 \text{ mM}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$  pour les cytochromes P450 on peut déduire directement de l'amplitude du pic la concentration totale en cytochromes

P450 contenu dans les microsomes. Dans la figure 4 est montré le spectre de différence en présence de monoxide de carbone obtenu avec une solution de microsomes 10 fois diluée de la solution stock. A partir du spectre qui montre le pic caractéristique à 453,5 nm, nous avons déterminé la concentration globale dans les microsomes après induction est de 1,2 micromolaire. La culture de contrôle (PES 1-3U) ne montrant dans les mêmes conditions expérimentales et les mêmes conditions de sensibilité aucune trace détectable de cytochromes P450 nous pouvons conclure que le pic observé avec les microsomes de la culture induite de la souche WRCA doit provenir de l'expression de l'ADNC de la CA4H sur le plasmide.

#### 6.3 Obtention d'un spectre de perturbation de type I

suite à l'ajout de l'acide tr-cinnamique aux microsomes obtenus à partir de la culture induite de la souche WRCA

Une des propriétés les plus intéressantes des cytochromes P450 est la possibilité de pouvoir monitorer l'interaction de différentes molécules avec le site actif. En effet, la force du champ des ligands détermine des spectres typiques et bien codifiés (type I, II ou I inversé). Les spectres de type I, caractérisant généralement l'interaction d'un P450 avec son substrat spécifique, sont définis par la formation d'un pic négatif vers 420 nm et d'un pic positif vers 390 nm suite à la fixation du substrat au cytochrome P450. Afin de fournir une preuve supplémentaire que le pic à 453,5 nm observé en figure 4 est bien dû à la présence de la CA4H de topinambour dans les microsomes de levure et que la protéines y est sous une forme active capable de fixer son substrat propre, il a été tenté d'obtenir un tel spectre par l'adjonction du tr-cinnamate aux microsomes. Plus précisément, on répartit des quantités égales de la solution stock de microsomes (culture induite de la souche WRCA) diluée 10 fois dans un tampon contenant 50 mM Tris-HCl pH 7,4

et 1 mM EDTA dans deux cuvettes spectrophotométriques. En présence d'oxygène dissous dans le milieu, on peut raisonnablement supposer que les cytochromes P450 dans les microsomes sont sous leur forme oxydée, ayant fixé de

5 l'oxygène sur le groupe hème. Une ligne de base est faite entre 370 et 490 nm avec les deux cuvettes identiques.

Puis on ajoute à la cuve d'essai du tr-cinnamate à une concentration de 100 micromolaire, et on réalise un spectre différentiel absorption (cytochrome P450 oxydé

10 versus cytochrome P450 oxydé plus substrat spécifique) entre 370 et 490 nm. Dans la figure 5 est montré l'obtention d'un spectre de perturbation de type I caractéristique d'un P450 après fixation de son substrat, en utilisant la même solution stock de microsomes que sous

15 6.2 qui montre bien la formation d'un pic négatif important à 418 nm et d'un pic positif à 390 nm après l'ajout du tr-cinnamate. Ce même type de spectre différentiel a été observé après l'ajout du tr-cinnamate à des microsomes de topinambour (Benveniste et Durst, 1974, C.R.

20 Acad. Sc. Paris 278D, pp 1487-1490). Ainsi le polypeptide issu de l'ADNc de la CA4H de topinambour possède toutes les caractéristiques spectrales d'un cytochrome P450 dans les microsomes de levure et est capable de fixer spécifiquement le tr-cinnamate comme substrat.

25 6.4 Démonstration de la conversion du tr-cinnamate en tr-coumarate par une culture de WRCA en milieu galactosé

Il est indispensable de prouver que le spectre de perturbation observée suite à l'ajout du tr-cinnamate aux microsomes contenant la CA4H de topinambour est correlé à une activité catalytique de la CA4H qui résulte en la formation de tr-coumarate. Il est également très important de prouver que le tr-cinnamate ne rencontre pas de barrière de diffusion lors d'une culture de cellules entières et que le coumarate formé sera accumulé dans le milieu de culture, en vue d'une application de bioconver-

28

sion sur cellules entières à l'échelle industrielle. A cette fin l'expérience suivante a été réalisée : 0,5 ml d'une préculture de WRCA en milieu minimum ont été ajoutés à 2 ml de milieu YPGAL frais contenant 10 microM de tr-  
5 cinnamate, puis on incube à 27°C sous agitation modérée. Après 30 minutes, les cellules sont centrifugées et on pré-  
lève 1 ml du surnageant auquel on ajoute 1 ml d'une solu-  
tion saturée en NaCl et 1 ml d'acétate d'éthyle. Après  
10 avoir mélangé rigoureusement les deux phases sur vortex,  
on sépare les phases organique et aqueuse par centrifuga-  
tion, et on prélève un aliquot de la phase organique (acé-  
tate d'éthyle). On évapore à l'air et on reprend dans une  
solution 10 % méthanol. 20 microlitres de l'échantillon sont séparés  
par HPLC sur colonne C18 en se servant d'un gradient linéaire.

15

20

25

30

35

29

COMPOSITION DU GRADIENT HPLCTABLEAU I

5

10	TEMPS (min)	DEBIT (ml/min)	COMPOSITION	
			A(%)	B(%)
15	0.00	1.00	100	0
	1.00	1.00	90	10
	15.00	1.00	70	30
20	15.10	1.00	40	60
	17.00	1.00	100	0

25

A = 0.01% TFA

B = Acetonitrile

30

35

Un étalonnage préalable avec du tr-cinnamate et du tr-coumarate commercial pur avait démontré que sous les conditions de chromatographie décrites les deux produits sont bien séparés. En effet le coumarate sort après 8 minutes environ, tandis que le tr-cinnamate sort après 11,5 min. En figure 6 est montré le chromatogramme de l'échantillon issu de l'expérience décrite ci-dessus. La longueur d'onde de détection choisie de 292 nm est un compromis où les deux substances absorbent bien. Il est clairement visible qu'il ne reste plus que des quantités négligeables et à peine détectables, alors qu'il apparaît un seul pic majeur à la position du tr-coumarate. Ainsi il est démontré que le polypeptide issu de l'ADNc végétal cloné est bien une enzyme à cytochrome P450 sur la base de ses propriétés spectrales et que son activité catalytique est l'hydroxylation du tr-cinnamate en position quatre pour former le tr-coumarate, sans apparition de produits secondaires. Le tr-cinnamate est apparemment accessible aux cytochromes P450 intracellulaires, tandis que le produit de transformation est retrouvé dans le surnageant. Ni substrat, ni le produit de la conversion sont apparemment toxique pour la levure.

6.5 Détermination de la constante d'affinité de la CA4H pour le tr-cinnamate dans les microsomes de levure

L'amplitude totale observée entre le maximum positif à 370 nm et le pic négatif à 418 nm dans un spectre de perturbation de type I, varie en fonction du substrat spécifique ajouté, lorsque le substrat est en concentration limitante par rapport aux cytochromes P450 capables de fixer ce substrat présents dans les microsomes. Si l'on reporte les valeurs inverses des amplitudes d'absorption mesurées dans un spectre de perturbation de type I en fonction de la valeur inverse des concentrations croissantes de substrat ajouté (représentation de Lineweaver-Burk), on obtient une droite et la constante d'affinité

du cytochrome P450 considéré pour son substrat spécifique peut être calculé directement à partir du point d'intersection de la droite avec l'axe X. En figure 7 est montrée une représentation de Lineweaver-Burk en reportant la variation de l'amplitude d'absorption dans un spectre de type I en fonction du tr-cinnamate ajouté en quantités croissantes à des microsomes oxydés issus d'une culture induite de la souche WRCA. Les conditions expérimentales étant identiques à celles décrites sous 3.3 à l'exception des concentrations en tr-cinnamate utilisées allant de 0,2, 1,0, 3,0, 10,0 à 30,0 microm, elles ne seront pas reprises ici. La constante d'affinité de la CA4H de topinambour dans les microsomes de levure en présence de la P450 Réductase endogène de levure ainsi mesurée est de 2,2 microm, ce qui est en excellente concordance avec les valeurs obtenues avec des microsomes de topinambour qui varient entre 1 et 10 microm selon les préparations (F. Durst, communication personnelle). Il est donc évident que la levure S. cer. fournit l'environnement similaire à celui de la plante pour l'expression efficace de la CA4H.

6.6 Détermination de l'efficacité de couplage entre la P450 Réductase de levure et la CA4H de topinambour dans les microsomes de la souche WRCA

Les cytochromes P450 ne sont pas autosuffisants pour effectuer l'hydroxylation de leurs substrats. Le complexe enzymatique actif est constitué de deux composants, le cytochrome P450 et la P450 Réductase, qui assure la chaîne de transport des électrons nécessaires à l'hydroxylation du NADPH vers le Cytochrome P450. En cas de couplage parfait (illustré en figure 8) on observera donc la consommation d'une molécule de NADPH par molécule de produit formé. Aucun cytochrome P450 végétal n'ayant jamais été exprimé chez la levure, il est primordial de s'assurer que la levure fournit l'environnement réducteur adéquat à l'activité enzymatique de la CA4H de topinambour.

Dans ce but l'expérience suivante a été réalisée : un mélange réactionnel constitué de 6 nM de CA4H (dilution 1 pour 200 de la solution stock de microsomes) dans un tampon phosphate 50 mM pH 7,4 et de NADPH réduit 0,1 mg/ml 5 est réparti à parts égales dans deux cuvettes spectrophotométriques. La quantité de NADPH réduit dans les deux cuves étant identique, l'absorption différentielle initiale mesurée à 350 nm est zéro. Puis on ajoute à la cuvette d'essai du tr-cinnamate à la concentration finale 10 de 10 microM. En cas de couplage parfait on doit enregistrer à 350 nm une diminution d'absorption correspondant à la consommation d'une quantité équivalente de NADPH. En figure 8 est montré l'enregistrement de cette expérience. L'ajout de 10 nmoles de tr-cinnamate résulte en 15 une diminution de l'absorption initiale dans la cuve d'essai de 0,06 OD.

En se servant du coefficient molaire du NADPH réduit ( $6200 M^{-1} \cdot cm^{-1}$ ) il est facile de convertir la variation d'absorption en moles NADPH oxydés. En effet, après 20 l'ajout de 10 nmoles de tr-cinnamate 9,7 nmoles de NADPH ont été oxydés, ce qui résulte en un facteur de couplage de 1,03. Il est donc évident que la P450 Réductase de la levure est capable de parfaitement assurer la chaîne de transport des électrons vers la CA4H de topinambour afin 25 de le faire fonctionner.

#### 6.7 Détermination de la vitesse maximale de conversion de la CA4H dans les microsomes de levure ainsi que le Km

La vitesse maximale de conversion du cytochrome 30 P450 végétal mesurée dans les microsomes de levure est une valeur très importante pour apprécier si S. Cer est un outil industriel intéressant pour y réaliser des bio-conversions à l'aide de cytochromes P450, la vitesse de la réaction enzymatique étant un des critères principaux. Ceci d'autant plus que les cytochromes P450 de mammifères 35

sont connus pour être des enzymes dites "lentes". Dans la même expérience on déterminera également la constante de Michaelis, qui donne la concentration en substrat nécessaire pour que la CA4H fonctionne à 50 % de sa vitesse maximale.

5 Sous 3.6 il a été démontré que l'efficacité de couplage entre la P450 Réductase de levure et la CA4H exprimé par la relation de NADPH consommé pour substrat converti est très voisin de 1. De ce fait il est possible de suivre l'activité de la CA4H en fonction de la concentration du tr-cinnamate ajouté par la vitesse de consommation du NADPH. En effet, le NADPH réduit absorbe fortement à une longueur d'onde de 340 nm (coefficient d'absorption molaire = 6200) et la pente de la variation de l'absorption dans le temps est directement proportionnelle à la

10 vitesse de la transformation du tr-cinnamate en coumarate par la CA4H. Néanmoins afin d'éviter des interférences avec le coumarate formé qui absorbe faiblement à 340 nm, les mesures seront effectuées à 350 nm, une longueur d'onde où seul le NADPH réduit montre une forte absorption.

15 20 Plus précisément, on réalise un mélange réactionnel, constitué d'une dilution 200 fois (concentration finale en CA4H est de 6 nM) de la solution stock de microsomes dans un tampon phosphate 50 mM à pH 7,4 et du NADPH réduit en excès à 0,1 mg/ml. Ce mélange est réparti à parties égales dans deux cuvettes spectrophotométriques, on ajoute des concentrations croissantes de tr-cinnamate au temps zéro, puis on suit par spectrophotométrie différentielle la diminution de l'absorption initiale à 350 nm dans le temps dans la cuve d'essai par rapport à la cuve témoin. On a effectué les enregistrements de cette expérience pour des concentrations en tr-cinnamate de 0, 0,4,

25 30 35 0,8, 1,6, 3,2, 6,4, 12,6 et 25 microM. A partir des pentes obtenues, il est donc possible de les convertir directement en activité CA4H et de réaliser une représentation selon Lineweaver-Burk en reportant l'inverse des activités CA4H

mesurées en fonction de l'inverse de la concentration de tr-cinnamate ajoutée au milieu réactionnel. Le point d'intersection de la droite ainsi obtenue (figure 9 avec l'axe Y donnent la valeur de la vitesse maximum de conversion de la CA4H, tandis que le point d'intersection avec l'axe X donne la valeur du Km. La vitesse maximale *in vitro* de  $400 \pm 50 \text{ min}^{-1}$  est la plus grande obtenue à ce jour pour un P450 eucaryotique ce qui montre bien que dans un contexte génétique où il est possible de surexprimer simultanément la P450 Réductase de levure et la CA4H, *S. cer.* fournit le meilleur environnement connu actuellement afin de faire fonctionner de façon très efficace un cytochrome P450 végétal. Sur la base des activités mesurées *in vitro*, la souche WRCA est un excellent candidat pour réaliser la bioconversion du tr-cinnamate en coumarate par la CA4H à l'échelle industrielle. Dans ce sens la valeur très basse du Km de 1,2 microM acquiert toute son importance, puisque de faibles concentrations intracellulaires en tr-cinnamate de l'ordre micromolaire suffisent pour faire tourner la CA4H à plein régime.

#### 5.8 Mesure directe de la vitesse maximale de conversion de la CA4H sur des microsomes de WRCA

La mesure de la consommation de NADPH est certainement très appropriée au niveau expérimental, mais ne constitue qu'une preuve indirecte de l'activité enzymatique de la CA4H. Il reste donc très important de valider les résultats ainsi obtenus sous 3.7 par des mesures d'activité réelle, c'est-à-dire les valeurs comparables pour la vitesse maximale de conversion de la CA4H doivent être retrouvées lorsqu'on suit l'activité enzymatique par la mesure de la quantité de tr-coumarate formé. A cette fin l'expérience suivante a été réalisée : un mélange réactionnel de 1 ml contenant 50 mM tampon phosphate pH 7,4, 50 microM tr-cinnamate, 0,1 mg/ml NADPH et 35 12 pmoles de CA4H (dilution 1 pour 1000 de la solution

stock de microsomes) est préparé sur la glace. Les microsomes sont ajoutés en dernier lieu, puis la réaction est démarré en plaçant le milieu réactionnel complet à 37°C. La réaction est arrêtée aux temps indiqués au tableau 2, 5 par prélèvement d'un échantillon de 50 microlitres auquel on ajoute 2,5 microlitres de l'acide trifluoroacétique, puis on sépare par HPLC dans les conditions décrites ci-dessus. La figure 10 montre la cinétique de la formation du coumarate en se servant des valeurs du tableau 1. En 10 effet dans une initiale de 6 minutes où le substrat est en excès, la formation de tr-coumarate est linéaire dans le temps et décline rapidement ensuite pour atteindre le plateau après 15 minutes seulement. Ceci se traduit par un rapide déclin de la vitesse maximale quand le substrat 15 commence à devenir limitant. Il est très important à noter que la valeur de la vitesse maximale de conversion de la CA4H est de  $350 \text{ min}^{-1}$  lorsque le substrat est en excès, une valeur qui est en parfaite concordance avec les valeurs trouvées par test indirect, ce qui renforce les 20 commentaires faits sous 3.7.

TABLEAU 2

	Incubation (min.)	tr-coumarate (n moles)	Activité spécifique (min <sup>-1</sup> )
25	0	0	-
	3	13	350
	6	25	350
	10	32	265
	15	41	221
	15'50	46	n.d.
	25	44	n.d.

VII) Procédé de bioconversion mettant en oeuvre une souche de levure surexprimant la P450 Réductase endogène ainsi qu'un cytochrome P450 végétal. Exemplification par la production de tr-coumarate à partir du tr-cinnamate sur cellules entières contenant la CA4H de topinambour.

Une culture de 200 ml dans un erlenmeyer de 1 L de la souche WRCA est incubée à 27°C sous agitation vigoureuse (200 rpm) dans un milieu YPGAL jusqu'à 5 DO (phase stationnaire de saturation). A ce moment on ajoute du cinnamate à une concentration finale de 100 microM, puis on continue l'incubation. On prélève des échantillons de 100 microlitres au moment de l'ajout du tr-cinnamate et puis 1, 10, 30, et 100 minutes après l'ajout. Puis on procède à l'extraction selon les méthodes décrites sous 3.3, et on analyse les échantillons par chromatographie HPLC (voir 3.3). La longueur d'onde d'analyse est volontairement choisie à 314 nm, une longueur d'onde où l'absorption du tr-coumarate est presque maximale tandis que le tr-cinnamate n'absorbe que très peu. L'amplitude des pics d'absorption n'est par conséquence pas identique pour une même concentration de tr-cinnamate et du tr-coumarate. Le but de cette expérience étant de quantifier l'évolution de la quantité de tr-coumarate trouvée dans le milieu de culture en fonction du temps, une échelle de concentrations connues de tr-coumarate a été utilisée pour la calibration, permettant de traduire l'amplitude du pic de coumarate en concentration ou en nombre de molécules de tr-coumarate formé. La superposition de 4 chromatogrammes a été réalisée sur les 4 échantillons prélevés aux temps indiqués ci-dessus. Il est évident que très vite après l'ajout du tr-cinnamate, on peut déceler des quantités importantes dans le milieu de culture sans apparition de produits secondaires. Vu la valeur de la constante d'affinité de la CA4H pour le tr-cinnamate qui est

de l'ordre micromolaire, il est clair que au moins 95 % du substrat initialement présent dans la culture seront transformés en tr-coumarate avant que la concentration devienne limitante. Le fait de retrouver des quantités 5 importantes de tr-coumarate rapidement dans le milieu de culture laisse supposer que le tr-cinnamate diffuse suffisamment vite dans la cellule pour que la CA4H puisse fonctionner à plein régime, et aussi que le produit formé n'est pas retenu ou métabolisé dans la levure mais excréte 10 dans le milieu. Ceci rend faisable la récupération puis la purification du produit lors d'une bioconversion à l'échelle industrielle, mais explique aussi l'apparente inocuité du coumarate pour la cellule. Il est en effet peu probable d'obtenir en grande quantité un produit par bioconversion s'il est accumulé à l'intérieur de la cellule. 15 Sur la base des pics observés en figure 11 la productivité calculée est de 10 micromoles de coumarate formés/minute. litre de culture. En figure 11 est montrée une cinétique qui reporte le nombre de tr-coumarate formée par cellule 20 de levures (calculé à partir des chromatogrammes) en fonction du temps. Il est clair que ce processus de bioconversion est tout-à-fait stable dans le temps. Ceci est un critère essentiel pour l'application de la souche WRCA pour un procédé industriel d'obtention de tr-coumarate 25 par bioconversion. En extrapolant cette frappante stabilité de la CA4H de topinambour dans la levure par rapport à d'autres cytochromes P450 de mammifères la productivité citée ci-dessus sera d'environ 10 grammes de coumarate formé par jour et par litre de culture dans des conditions 30 de laboratoire. Ces valeurs peuvent raisonnablement être améliorées d'un facteur 5 lors d'un procédé de fermentation industriel.

REVENDICATIONS

- 1) Souche de levure permettant la co-expression d'une activité mono-oxygénase de cytochrome P450 de plante et d'une NADPH-cytochrome P450-réductase endogène ou hétérologue, caractérisée en ce que l'un des gènes de la NADPH-cytochrome P450-réductase ou du cytochrome P450 est intégré dans le chromosome de ladite souche, et, la souche est transformée par un vecteur portant une cassette d'expression de l'autre gène.
- 2) Souche selon la revendication 1, caractérisée en ce que le gène de cytochrome P450 microsomal d'origine végétale est intégré dans le chromosome de ladite souche de levure.
- 3) Souche de levure selon la revendication 1 ou 2 permettant la co-expression d'une activité mono-oxygénase de cytochrome P450 hétérologue et d'une NADPH-cytochrome P450-réductase endogène ou hétérologue, caractérisée en ce que le gène de la NADPH-cytochrome P450-réductase est intégré dans le génome chromosomique de ladite souche et la souche est transformée par un vecteur portant une cassette d'expression du gène de cytochrome P450 de plante.
- 4) Souche selon l'une des revendications 1 ou 2, caractérisée en ce que ledit vecteur est un vecteur d'intégration ou un vecteur répliquatif.
- 5) Souche selon la revendication 3, caractérisée en ce que les gènes de cytochrome P450 et NADPH-cytochrome -P450-réductase sont intégrés dans le chromosome de ladite souche.
- 6) Souche selon l'une des revendications 1 à 5, caractérisée en ce que le cytochrome P450 est la protéine CA4H d'Helianthus tuberosus.
- 7) Souche selon l'une des revendications 1 à 6, caractérisée en ce que ledit cytochrome P450 est la protéine CA4H d'Arabidopsis thaliana.
- 8) Souche selon l'une des revendications 1 à 7, caractérisée en ce que ledit gène dudit cytochrome P450 est un gène hybride.
- 9) Souche selon l'une des revendications 1 à 8, caractérisée en ce que la NADPH-cytochrome P450-réductase est la NADPH-cytochrome P450-réductase endogène de levure.
- 10) Souche selon l'une des revendications 1 à 9, caractérisée en ce que ledit gène de la NADPH-cytochrome P450-réductase consiste dans la séquence d'ADNc codant pour la NADPH-cytochrome P450-réductase hétérologue.

11) Souche selon l'une des revendications 1 à 10, caractérisée en ce que ledit gène de la NADPH-cytochrome P450-réductase est celui d'une NADPH-cytochrome P450-réductase d'origine végétale.

5 12) Souche selon la revendication 11, caractérisée en ce que la NADPH-cytochrome P450-réductase est une NADPH-cytochrome P450-réductase d'Arabidopsis thaliana.

13) Souche selon la revendication 11, caractérisée en ce que la NADPH-cytochrome P450-réductase est une NADPH-cytochrome P450-réductase d'Helianthus tuberosus.

10 14) Souche selon l'une des revendications 1 à 13, caractérisée en ce que les gènes de la NADPH-cytochrome P450-réductase et du cytochrome P450 sont intégrés dans le locus de la NADPH-cytochrome P450-réductase endogène sur des allèles différents.

15 15) Souche de levure selon l'une des revendications 1 à 14, caractérisée en ce que la levure est choisie parmi les genres Saccharomyces, Hansenula, Kluyveromyces, Pichia, et Yarrowia.

16) Souche selon la revendication 15, caractérisée en ce que la levure est du genre Saccharomyces cerevisiae.

20 17) Souche l'une des revendications 1 à 16, caractérisée en ce que dans ledit vecteur d'expression le gène de cytochrome P450 est mis sous le contrôle d'un promoteur inductible.

18) Souche selon la revendication 17, caractérisée en ce que ledit vecteur est le vecteur pYEDP60.

25 19) Souche selon l'une des revendications 1 à 18, caractérisée en ce que le gène de NADPH-cytochrome P450-réductase est placé sous le contrôle d'un promoteur hétérologue inductible.

30 20) Souche selon l'une des revendications 1 à 19, caractérisée en ce que le gène de NADPH-cytochrome P450-réductase et le gène de cytochrome P450 sont placés sous le contrôle d'un même promoteur inductible.

21) Souche selon l'une des revendications 17 à 20, caractérisée en ce que ledit promoteur inductible est le promoteur GAL10/CYC1.

35 22) Souche selon l'une des revendications 1 à 21, caractérisée en ce que ladite souche est obtenue à partir de la souche PES 1-3-U déposée à la Collection Nationale de Cultures de Microorganismes (CNCM) sous le n° I-1187.

23) Souche selon l'une des revendications 1 à 22, caractérisée en ce que ladite souche est la souche WRCA obtenue par transformation de la souche PES 1-3-U par le vecteur pCA4H/YeDP60.

24) Souche de levure selon l'une des revendications 1 à 23, caractérisée en ce qu'elle permet la co-expression de la NADPH-cytochrome P450-réductase et du cytochrome P450 dans un rapport molaire NADPH-cytochrome P450-réductase/cytochrome P450 optimum qui est entre 1/3 et 1/10.

25) Procédé de co-expression chez une levure de l'activité monooxygénase de cytochrome P450 microsomal de plante et de NADPH-cytochrome P450 endogène ou hétérologue, caractérisé en ce qu'on cultive dans un milieu de culture approprié une souche selon l'une des revendications 1 à 24.

26) Utilisation à des fins de bioconversion d'une souche de levure selon l'une des revendications 1 à 24.

27) Procédé de bioconversion destiné à la monooxydation spécifique d'un composé substrat d'un cytochrome P450, caractérisé en ce qu'on convertit un milieu contenant ledit composé ou un précurseur avec l'une des souches selon l'une des revendications 1 à 24, exprimant l'activité monooxygénase dudit cytochrome P450 et en ce qu'on récupère ledit composé substrat monooxygéné.

28) Procédé selon la revendication 27, caractérisé en ce que ledit milieu est un milieu de culture.

29) Procédé de bioconversion selon l'une des revendications 27 ou 28, caractérisé en ce que la monooxygénation est une hydroxylation stéréospécifique.

30) Procédé selon la revendication 29, caractérisé en ce que le cytochrome P450 est la CA4H, le composé substrat est le trans-cinnamate, et on récupère le trans-coumarate.

31) Séquence d'ADNc codant pour le cytochrome P450 CA4H d'Helianthus tuberosus.

32) Séquence d'ADNc codant pour le cytochrome P450 CA4H d'Arabidopsis thaliana.

33) Séquence d'ADNc selon la revendication 31 telle que représentée à la figure 1.

34) Séquence d'ADNc selon la revendication 32 telle que représentée à la Figure 12.

35) Séquence d'ADNc s'hybridant dans des conditions faiblement stringentes à 50°C et/ou présentant au moins 60 % d'homologie avec l'une des séquences selon l'une des revendications 31 à 34.

1/23

CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE:

- (A) LONGUEUR: 1608 paires de bases
- (B) TYPE: acide nucléique
- (C) NOMBRE DE BRINS: simple
- (D) CONFIGURATION: linéaire

TYPE DE MOLECULE: ADNc

ORIGINE:

- (A) ORGANISME: Helianthus tuberosus
- (B) SOUCHE: L. variété blanc commun
- (C) INDIVIDUEL ISOLE:
- (D) STADE DE DEVELOPPEMENT: tubercules agés

CARACTERISTIQUES:

- (A) EMPLACEMENT: 1..30, bordure 5' non codante
- (B) EMPLACEMENT: 31..1545, région codante sur le brin présenté
- (B) EMPLACEMENT: 1546..1608, bordure 3' non codante

PROPRIETES

ADNc codant pour un cytochrome P450 végétal, Cinnamate 4-hydroxylase (CA4H). EC 1.14.13.1

FIGURE 1A

FEUILLE DE REMPLACEMENT

2/23

SEQ ID NO: 1:

AAATCACACA ACACCACCA CACCGTAACC ATG GAC CTC CTC CTC ATA GAA AAA 54  
 Met Asp Leu Leu Leu Ile Glu Lys  
 1 5

ACC CTC GTC GCC TTA TTC GCC GCC ATT ATC GGC GCA ATA CTA ATC TCC 102  
 Thr Leu Val Ala Leu Phe Ala Ala Ile Ile Gly Ala Ile Leu Ile Ser  
 10 15 20

AAA CTC CGC GGT AAA AAA TTC AAG CTC CCA CCT GGC CCA ATC CCG GTT 150  
 Lys Leu Arg Gly Lys Lys Phe Lys Leu Pro Pro Gly Pro Ile Pro Val  
 25 30 35 40

CCA ATT TTC GGC AAC TGG CTA CAA GTT GGC GAT GAT TTG AAC CAC CGG 198  
 Pro Ile Phe Gly Asn Trp Leu Gln Val Gly Asp Asp Leu Asn His Arg  
 45 50 55

AAC TTA ACC GAT CTG GCT AAG AGG TTT GGT GAG ATC TTG CTG CTA CGC 246  
 Asn Leu Thr Asp Leu Ala Lys Arg Phe Gly Glu Ile Leu Leu Leu Arg  
 60 65 70

ATG GGG CAG AGG AAT CTG GTA GTT GTG TCT TCG CCT GAG CTT GCT AAA 294  
 Met Gly Gln Arg Asn Leu Val Val Ser Ser Pro Glu Leu Ala Lys  
 75 80 85

GAG GTG TTG CAT ACA CAA GGA GTG GAG TTT GGT TCG AGA ACA AGG AAT 342  
 Glu Val Leu His Thr Gln Gly Val Glu Phe Gly Ser Arg Thr Arg Asn  
 90 95 100

GTT GTG TTC GAT ATT TTT ACT GGG AAG GGT CAG GAT ATG GTG TTT ACG 390  
 Val Val Phe Asp Ile Phe Thr Gly Lys Gly Gln Asp Met Val Phe Thr  
 105 110 115 120

GTT TAT GGT GAG CAT TGG AGG AAG ATG AGG AGG ATC ATG ACC GTA CCC 438  
 Val Tyr Gly Glu His Trp Arg Lys Met Arg Arg Ile Met Thr Val Pro  
 125 130 135

TTT TTC ACC AAC AAA GTT GTT CAG CAA TAC AGG TAT GGG TGG GAG GCT 486  
 Phe Phe Thr Asn Lys Val Val Gln Gln Tyr Arg Tyr Gly Trp Glu Ala  
 140 145 150

GAG GCC GCG GCG GTT GTG GAC GAT GTG AAG AAG AAT CCG GCT GCA GCA 534  
 Glu Ala Ala Ala Val Val Asp Asp Val Lys Lys Asn Pro Ala Ala Ala  
 155 160 165

ACT GAA GGA ATC GTG ATC CGA AGA CGG TTA CAA CTC ATG ATG TAT AAC 582  
 Thr Glu Gly Ile Val Ile Arg Arg Arg Leu Gln Leu Met Met Tyr Asn  
 170 175 180

AAC ATG TTC AGA ATC ATG TTC GAC AGA CGA TTC GAA AGT GAA GAT GAT 630  
 Asn Met Phe Arg Ile Met Phe Asp Arg Arg Phe Glu Ser Glu Asp Asp  
 185 190 195 200

FIGURE 1B

FEUILLE DE REMPLACEMENT

3/23

CCC TTG TTT TTG AAA CTC AAG GCG TTG AAC GGT GAG AGG AGT CGA TTG 678  
 Pro Leu Phe Leu Lys Leu Lys Ala Leu Asn Gly Glu Arg Ser Arg Leu  
 205 210 215

GCG CAG AGC TTT GAG TAC AAC TAT GGC GAT TTC ATC CCT ATT TTG CGG 726  
 Ala Gln Ser Phe Glu Tyr Asn Tyr Gly Asp Phe Ile Pro Ile Leu Arg  
 220 225 230

CCG TTT TTG AGA AAT TAT TTG AAG TTG TGC AAG GAA GTT AAA GAT AAA 774  
 Pro Phe Leu Arg Asn Tyr Leu Lys Leu Cys Lys Glu Val Lys Asp Lys  
 235 240 245

AGG ATT CAG CTC TTC AAG GAT TAC TTC GTT GAC GAA AGG AAG AAG ATT 822  
 Arg Ile Gln Leu Phe Lys Asp Tyr Phe Val Asp Glu Arg Lys Lys Ile  
 250 255 260

GGA AGC ACT AAG AAA ATG GAC AAC AAT CAG TTG AAA TGT GCC ATT GAT 870  
 Gly Ser Thr Lys Lys Met Asp Asn Asn Gln Leu Lys Cys Ala Ile Asp  
 265 270 275 280

CAC ATT CTT GAA GCT AAA GAG AAG GGT GAG ATC AAT GAA GAC AAT GTT 918  
 His Ile Leu Glu Ala Lys Glu Lys Gly Glu Ile Asn Glu Asp Asn Val  
 285 290 295

CTT TAC ATT GTT GAA AAC ATC AAT GTT GCA GCA ATC GAG ACA ACT CTA 966  
 Leu Tyr Ile Val Glu Asn Ile Asn Val Ala Ile Glu Thr Thr Leu  
 300 305 310

TGG TCG ATC GAA TGG GGA ATT GCG GAG CTA GTT AAC CAT CCC GAG ATC 1014  
 Trp Ser Ile Glu Trp Gly Ile Ala Glu Leu Val Asn His Pro Glu Ile  
 315 320 325

CAA GCC AAA CTC AGG CAC GAG CTC GAC ACC AAG CTC GGG CCC GGT GTC 1062  
 Gln Ala Lys Leu Arg His Glu Leu Asp Thr Lys Leu Gly Pro Gly Val  
 330 335 340

CAG ATC ACC GAG CCC GAC GTC CAA AAC CTC CCT TAC CTC CAA GCC GTG 1110  
 Gln Ile Thr Glu Pro Asp Val Gln Asn Leu Pro Tyr Leu Gln Ala Val  
 345 350 355 360

GTC AAG GAA ACC CTC CGT CTC CGT ATG GCG ATC CCG CTT CTA GTC CCA 1158  
 Val Lys Glu Thr Leu Arg Leu Arg Met Ala Ile Pro Leu Leu Val Pro  
 365 370 375

CAC ATG AAC CTC CAT GAC GCT AAG CTC GGC GGG TTT GAC ATC CCG GCC 1206  
 His Met Asn His Asp Ala Lys Leu Gly Gly Phe Asp Ile Pro Ala  
 380 385 390

GAA AGC AAG ATC TTG GTC AAC GCG TGG TGG TTA GCA AAC AAC CCC GAC 1254  
 Glu Ser Lys Ile Leu Val Asn Ala Trp Trp Leu Ala Asn Asn Pro Asp  
 395 400 405

CAA TGG AAG AAA CCC GAG GAG TTT AGG CCA GAG AGG TTT TTG GAA GAG 1302  
 Gln Trp Lys Lys Pro Glu Glu Phe Arg Pro Glu Arg Phe Leu Glu Glu  
 410 415 420

4/23

GAA GCG AAG GTT GAG GCT AAC GGG AAT GAT TTT AGG TAC TTG CCG TTT 1350  
 Glu Ala Lys Val Glu Ala Asn Gly Asn Asp Phe Arg Tyr Leu Pro Phe  
 425 430 435 440

GGA GTC GGG AGA AGG AGT TGC CCC GGG ATT ATT CTT GCA TTG CCG ATA 1398  
 Gly Val Gly Arg Arg Ser Cys Pro Gly Ile Ile Leu Ala Leu Pro Ile  
 445 450 455

CTT GGT ATT ACA ATC GGG CGT TTG GTG CAG AAT TTC GAG CTG TTG CCT 1446  
 Leu Gly Ile Thr Ile Gly Arg Leu Val Gln Asn Phe Glu Leu Leu Pro  
 460 465 470

CCA CCG GGA CAG TCT AAG ATC GAT ACC GAT GAG AAG GGT GGG CAG TTT 1494  
 Pro Pro Gly Gln Ser Lys Ile Asp Thr Asp Glu Lys Gly Gly Gln Phe  
 475 480 485

AGT TTG CAT ATC TTG AAG CAC TCT ACT ATC GTA GCT AAA CCT AGG TCA 1542  
 Ser Leu His Ile Leu Lys His Ser Thr Ile Val Ala Lys Pro Arg Ser  
 490 495 500

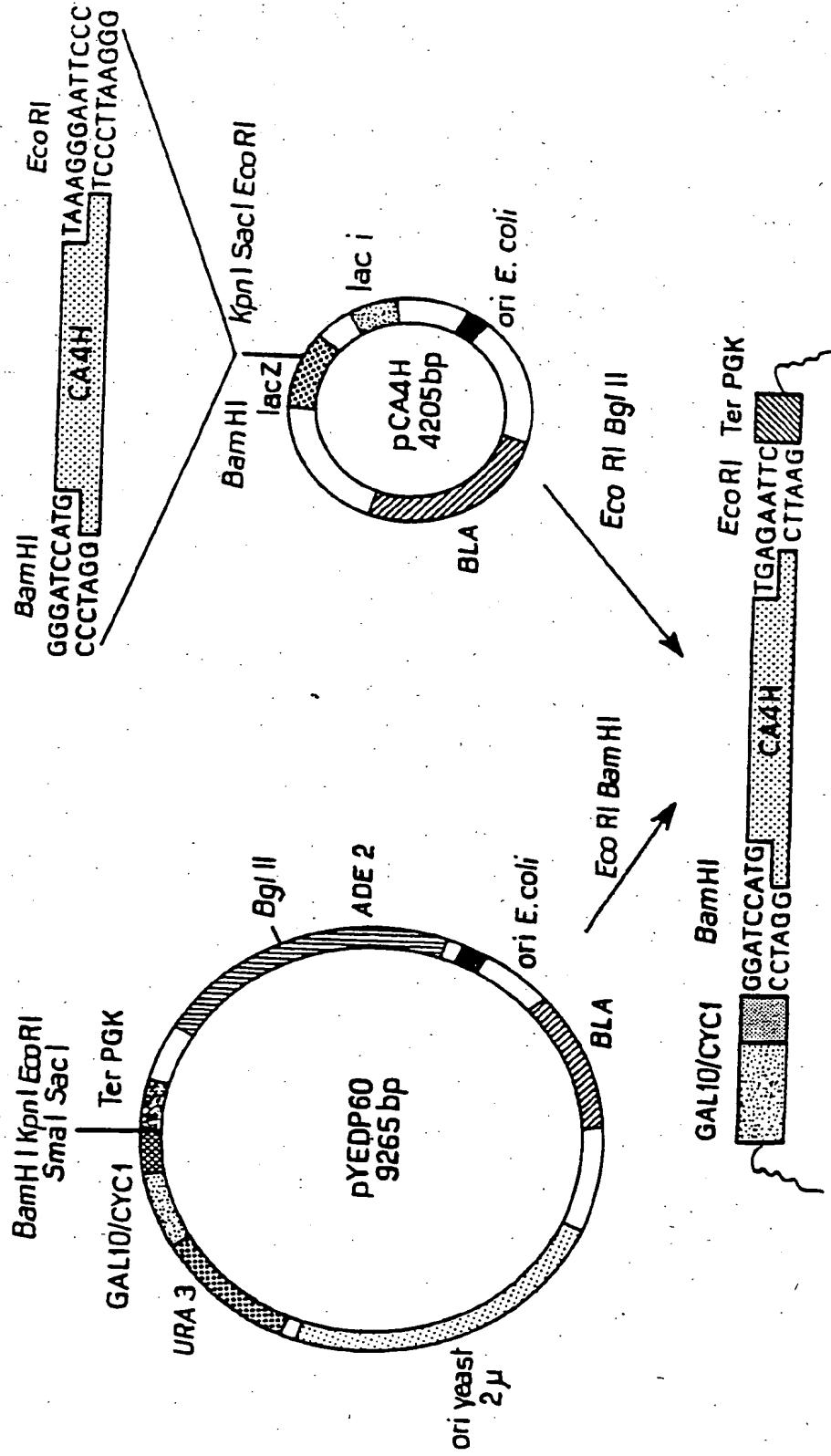
TTT TAAGGATTCT TGTTTATGTT CTTTATTGTA TGATAAACCA AGGGGGGGGG 1595  
 Phe  
 505

GAAAAAAA AAA 1608

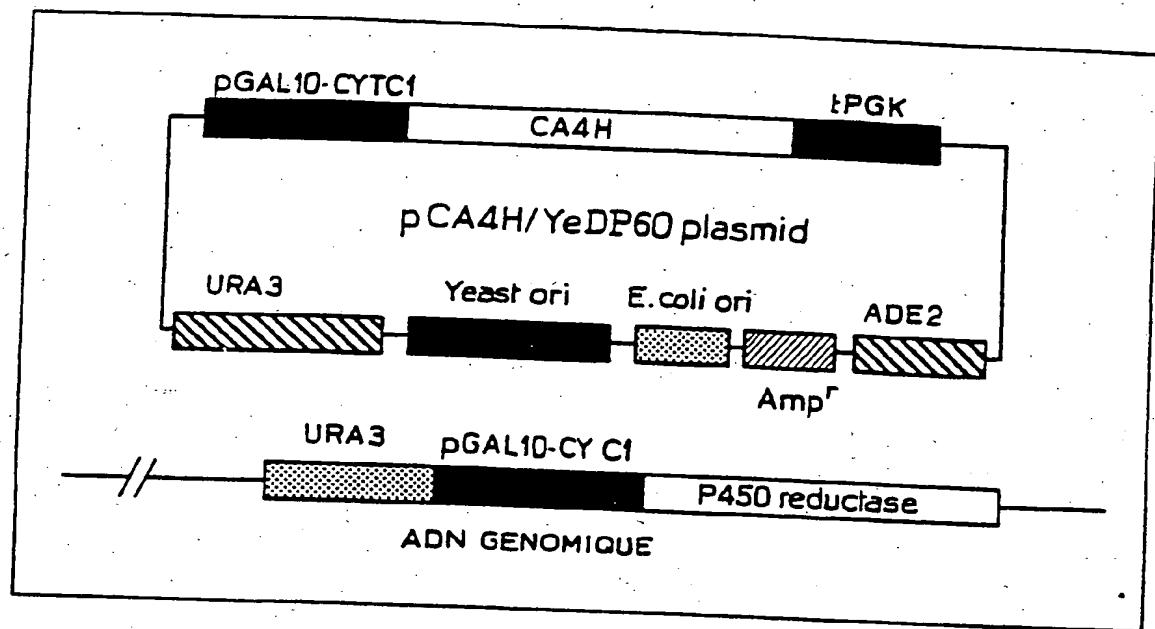
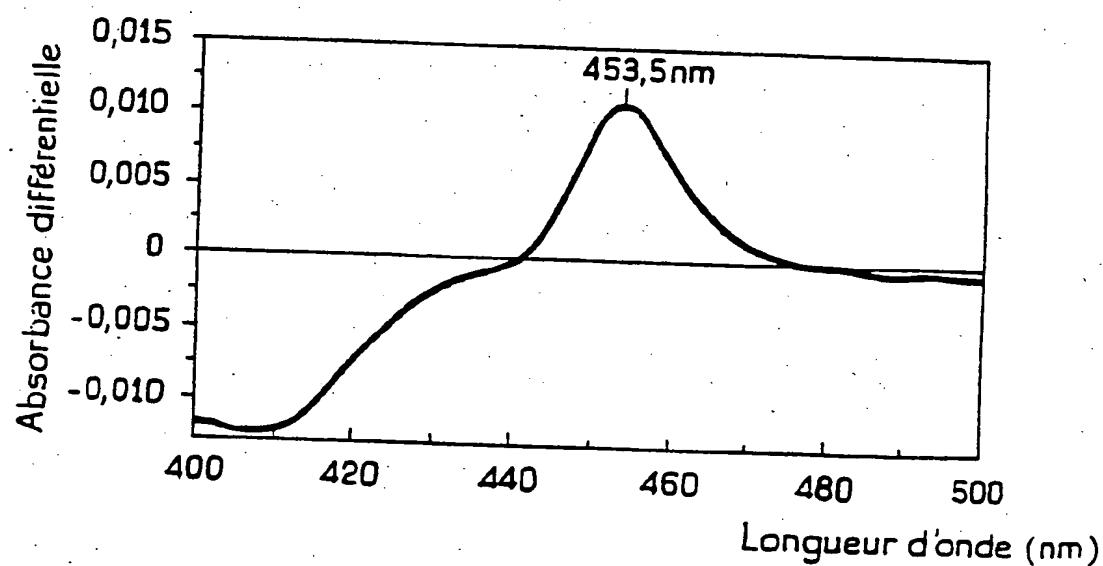
## FIGURE 1D

5/23

FIG. 2

CLONAGE DE LA CAAH DE TOPINAMBOUR DANS LE VECTEUR DE LEVURE PYEDP60

6/23

FIG. 3FIG. 4

7/23

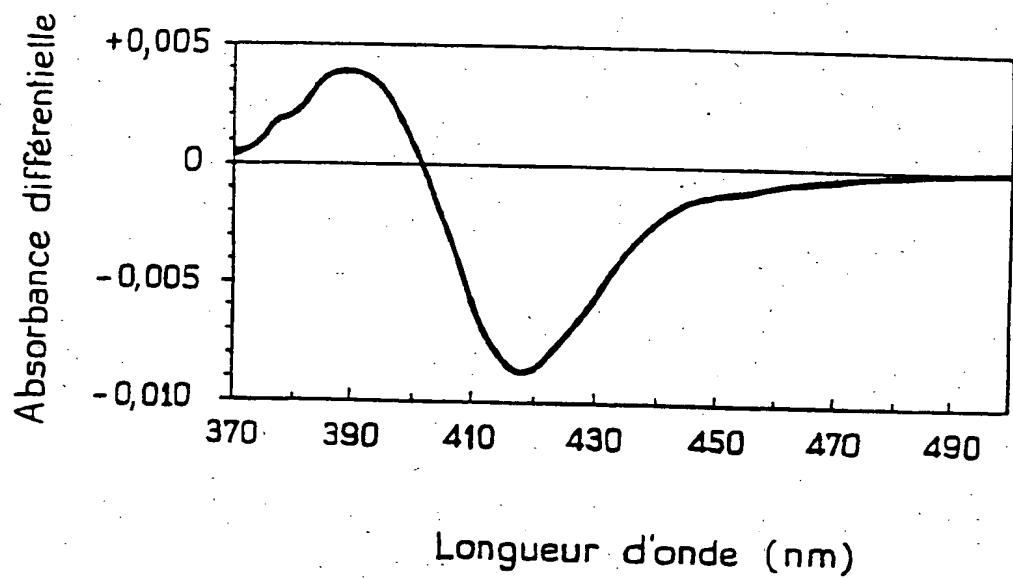
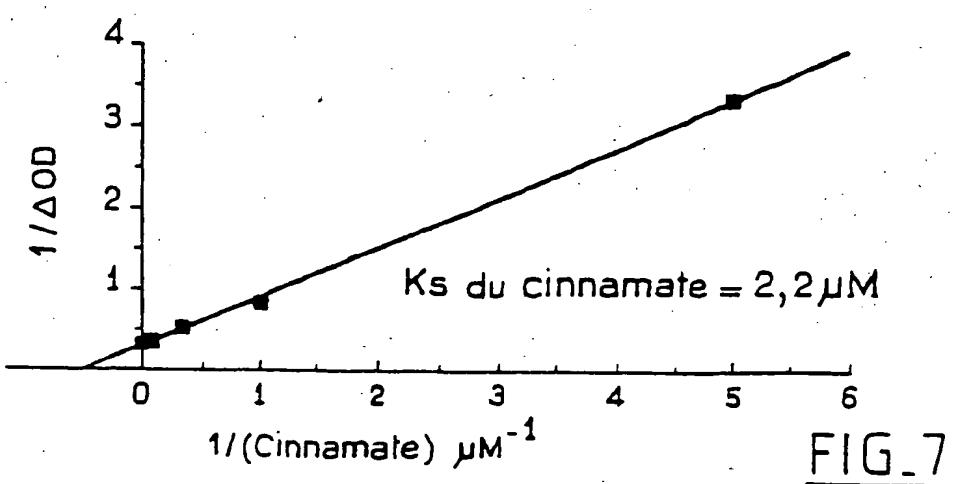
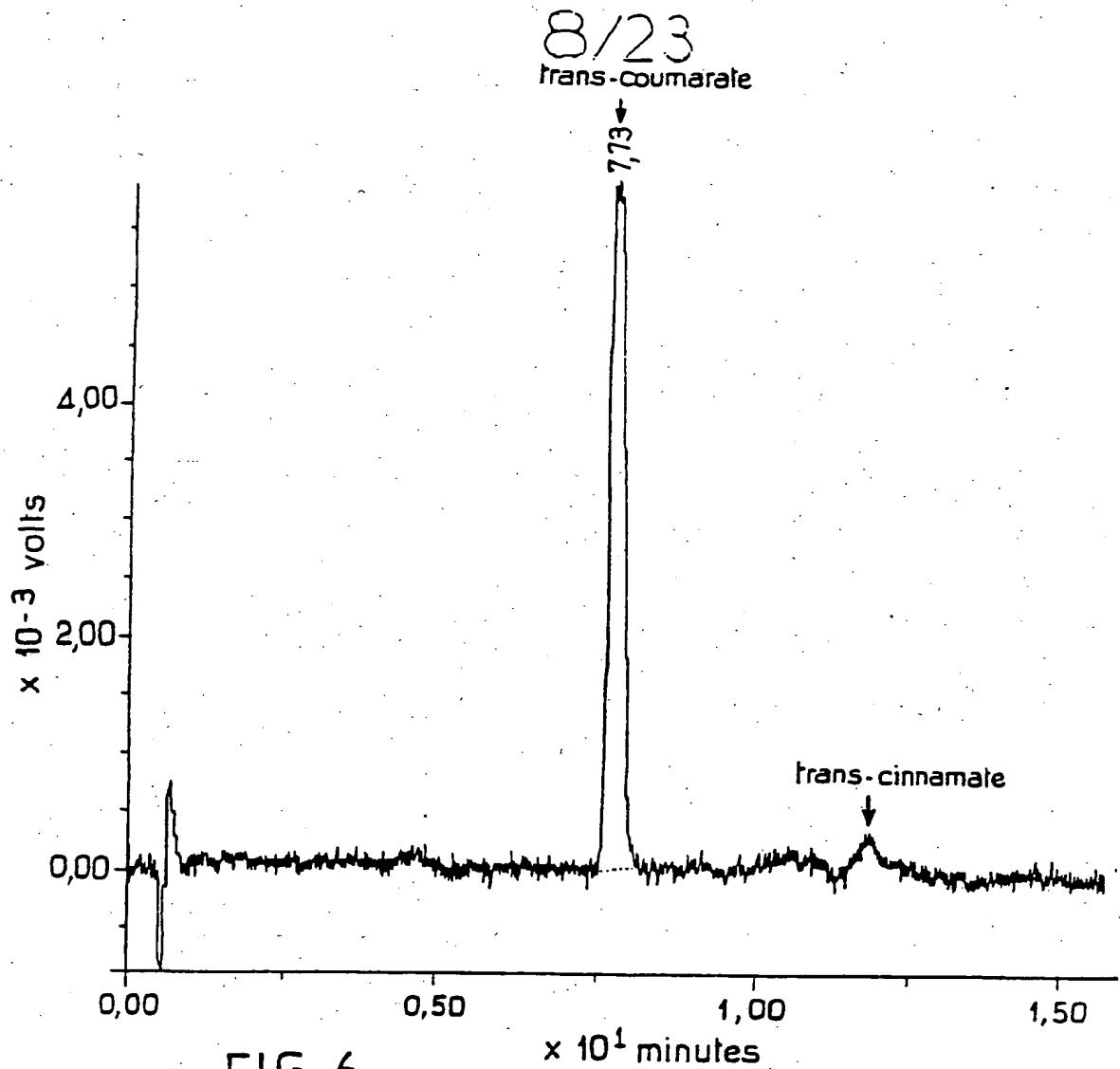
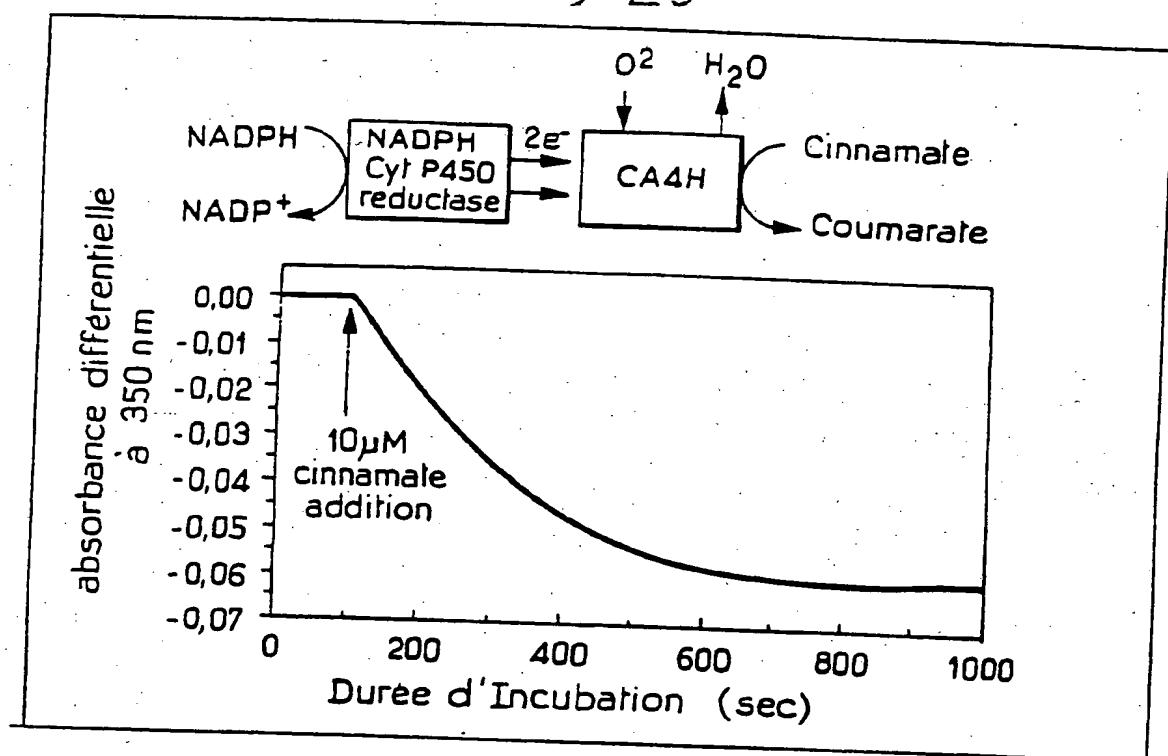
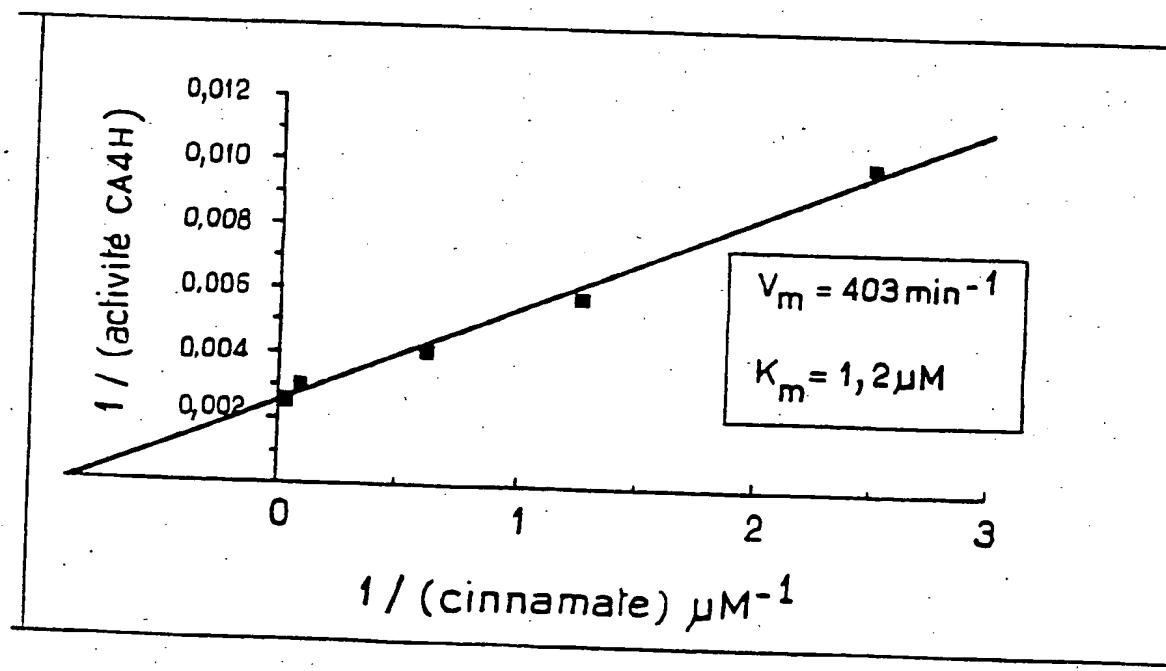


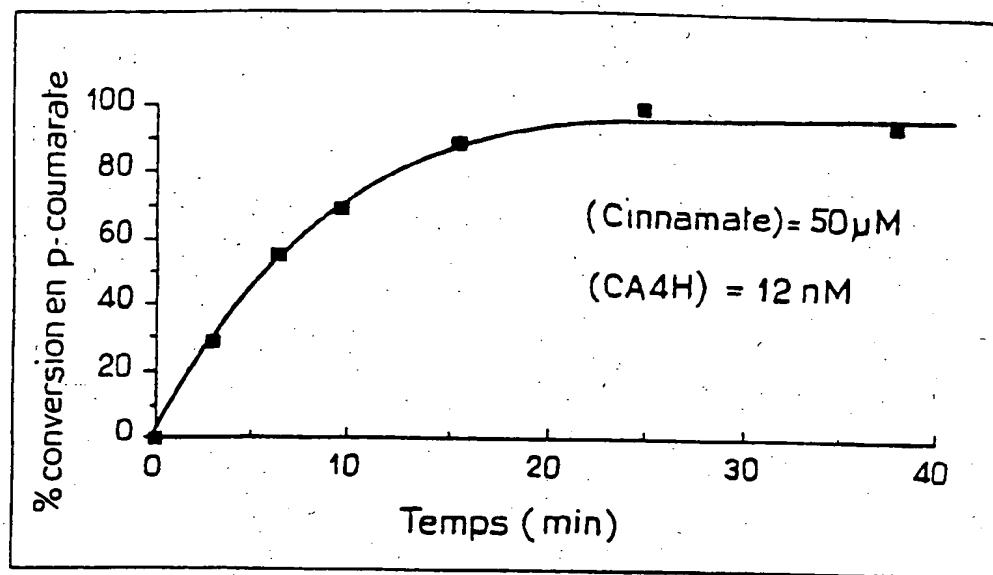
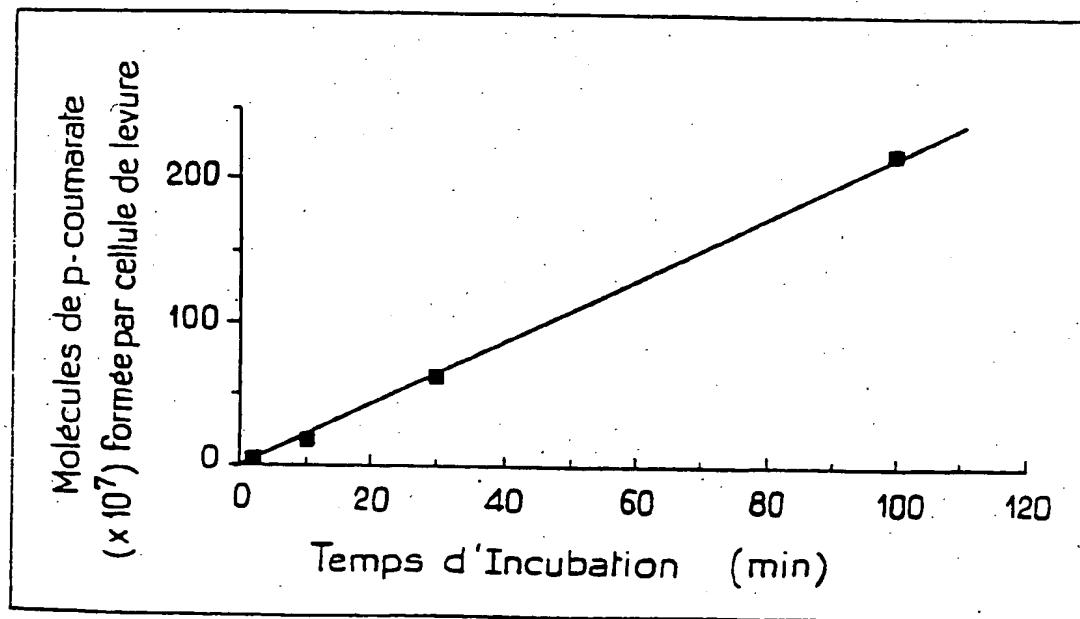
FIG.5



9/23

FIG. 8FIG. 9

10/23

FIG. 10FIG. 11

11/23

## CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE:

- (A) LONGUEUR: 1735 paires de bases
- (B) TYPE: acide nucléique
- (C) NOMBRE DE BRINS: simple
- (D) CONFIGURATION: linéaire

TYPE DE MOLECULE: ADNC

## ORIGINE:

- (A) ORGANISME: *Arabidopsis thaliana*
- (B) SOUCHE: Landsberg erecta
- (D) STADE DE DEVELOPPEMENT: jeune plantule, stade deux feuilles

## CARACTERISTIQUES:

- (A) EMPLACEMENT: 1..48, bordure 5' non-codante
- (B) EMPLACEMENT: 49..1566, région codante sur le brin présenté
- (C) EMPLACEMENT: 1567..1735, bordure 3' non-codante

## PROPRIETES:

ADNC codant pour un cytochrome P450 végétal, la cinnamate 4-hydroxylase (CA4H), E.C. 1.14.13.1

## FIGURE 12A

12/23

## DESCRIPTION DE LA SEQUENCE: SEQ ID NO: 3:

CAGTGTGAGT AATTTAGAAA CAATATCATT GCGGATACAC AAACTATA ATG GAC CTC 57  
 Met Asp Leu 1

CTC TTG CTG GAG AAG TCT CTA ATC GCC GTC TTC GTG GCG GTG ATT CTC 105  
 Leu Leu Leu Glu Lys Ser Leu Ile Ala Val Phe Val Ala Val Ile Leu  
 5 10 15

GCC ACG GTG ATT TCA AAG CTC CGC GGC AAG AAA TTG AAG CTA CCT CCA 153  
 Ala Thr Val Ile Ser Lys Leu Arg Gly Lys Lys Leu Lys Pro Pro  
 20 25 30 35

GGT CCT ATA CCA ATT CCG ATC TTC GGA AAC TGG CTT CAA GTA GGA GAT 201  
 Gly Pro Ile Pro Ile Phe Gly Asn Trp Leu Gln Val Gly Asp  
 40 45 50

GAC CTC AAC CAC CGT AAT CTC GTC GAT TAC GCT AAG AAA TTC GGC GAT 249  
 Asp Leu Asn His Arg Asn Leu Val Asp Tyr Ala Lys Lys Phe Gly Asp  
 55 60 65

CTC TTC CTC CTC CGT ATG GGT CAG CGT AAC CTA GTC GTC GTC TCT TCA 297  
 Leu Phe Leu Leu Arg Met Gly Gln Arg Asn Leu Val Val Val Ser Ser  
 70 75 80

CCG GAT CTA ACC AAG GAA GTG CTC CAC ACA CAA GGC GTT GAG TTT GGA 345  
 Pro Asp Leu Thr Lys Glu Val Leu His Thr Gln Gly Val Glu Phe Gly  
 85 90 95

TCT AGA ACG AGA AAC GTC GTG TTC GAC ATT TTC ACC GGG AAA GGT CAA 393  
 Ser Arg Thr Arg Asn Val Val Phe Asp Ile Phe Thr Gly Lys Gly Gln  
 100 105 110 115

GAT ATG GTG TTC ACT GTT TAC GGC GAG CAT TGG AGG AAG ATG AGA AGA 441  
 Asp Met Val Phe Thr Val Tyr Gly Glu His Trp Arg Lys Met Arg Arg  
 120 125 130

ATC ATG ACG GTT CCT TTC ACC AAC AAA GTT GTT CAA CAG AAT CGT 489  
 Ile Met Thr Val Pro Phe Phe Thr Asn Lys Val Val Gln Gln Asn Arg  
 135 140 145

GAA GGT TGG GAG TTT GAA GCA GCT AGT GTT GTT GAA GAT GTT AAG AAG 537  
 Glu Gly Trp Glu Phe Glu Ala Ala Ser Val Val Glu Asp Val Lys Lys  
 150 155 160

AAT CCA GAT TCT GCT ACG AAA GGA ATC GTG TTG AGG AAA CGT TTG CAA 585  
 Asn Pro Asp Ser Ala Thr Lys Gly Ile Val Leu Arg Lys Arg Leu Gln  
 165 170 175

TTG ATG ATG TAT AAC AAT ATG TTC CGT ATC ATG TTC GAT AGA AGA TTT 633  
 Leu Met Met Tyr Asn Asn Met Phe Arg Ile Met Phe Asp Arg Arg Phe  
 180 185 190 195

FIGURE 12B

FEUILLE DE REMPLACEMENT

13/23

GAG AGT GAG GAT AGT CCT CTT TTC CTT AGG CTT AAG GCT TTG AAT GGT 681  
 Glu Ser Glu Asp Ser Pro Leu Phe Leu Arg Leu Lys Ala Leu Asn Gly  
 200 205 210

GAG AGA AGT CGA TTA GCT CAG AGC TTT GAG TAT AAC TAT GGA GAT TTC 729  
 Glu Arg Ser Arg Leu Ala Gln Ser Phe Glu Tyr Asn Tyr Gly Asp Phe  
 215 220 225

ATT CCT ATC CTT AGA CCA TTC CTC AGA GGC TAT TTG AAG ATT TGT CAA 777  
 Ile Pro Ile Leu Arg Pro Phe Leu Arg Gly Tyr Leu Lys Ile Cys Gln  
 230 235 240

GAT GTG AAA GAT CGA AGA ATC GCT CTT TTC AAG AAG TAC TTT GTT GAT 825  
 Asp Val Lys Asp Arg Arg Ile Ala Leu Phe Lys Lys Tyr Phe Val Asp  
 245 250 255

GAG AGG AAG CAA ATT GCG AGT TCT AAG CCT ACA GGT AGT GAA GGA TTG 873  
 Glu Arg Lys Gln Ile Ala Ser Ser Lys Pro Thr Gly Ser Glu Gly Leu  
 260 265 270 275

AAA TGT GCC ATT GAT CAC ATC CTT GAA GCT GAG CAG AAG GGA GAA ATC 921  
 Lys Cys Ala Ile Asp His Ile Leu Glu Ala Glu Gln Lys Gly Glu Ile  
 280 285 290

AAC GAG GAC AAT GTT CTT TAC ATC GTC GAG AAC ATC AAT GTC GCC GCG 969  
 Asn Glu Asp Asn Val Leu Tyr Ile Val Glu Asn Ile Asn Val Ala Ala  
 295 300 305

ATT GAG ACA ACA TTG TGG TCT ATC GAG TGG GGA ATT GCA GAG CTA GTG 1017  
 Ile Glu Thr Thr Leu Trp Ser Ile Glu Trp Gly Ile Ala Glu Leu Val  
 310 315 320

AAC CAT CCT GAA ATC CAG AGT AAG CTA AGG AAC GAA CTC GAC ACG GTT 1065  
 Asn His Pro Glu Ile Gln Ser Lys Leu Arg Asn Glu Leu Asp Thr Val  
 325 330 335

CTT GGA CCG GGT GTG CAA GTC ACC GAG CCT GAT CTT CAC AAA CTT CCA 1113  
 Leu Gly Pro Gly Val Gln Val Thr Glu Pro Asp Leu His Lys Leu Pro  
 340 345 350 355

TAC CTT CAA GCT GTG GTT AAG GAG ACT CTT CGT CTG AGA ATG GCG ATT 1161  
 Tyr Leu Gln Ala Val Val Lys Glu Thr Leu Arg Leu Arg Met Ala Ile  
 360 365 370

CCT CTC CTC GTG CCT CAC ATG AAC CTC CAT GAT GCG AAG CTC GCT GGC 1209  
 Pro Leu Leu Val Pro His Met Asn Leu His Asp Ala Lys Leu Ala Gly  
 375 380 385

TAC GAT ATC CCA GCA GAA AGC AAA ATC CTT GTT AAT GCT TGG TGG CTA 1257  
 Tyr Asp Ile Pro Ala Glu Ser Lys Ile Leu Val Asn Ala Trp Trp Leu  
 390 395 400

GCA AAC AAC CCC AAC AGC TGG AAG AAG CCT GAA GAG TTT AGA CCA GAG 1305  
 Ala Asn Asn Pro Asn Ser Trp Lys Lys Pro Glu Glu Phe Arg Pro Glu  
 405 410 415

14/23

AGG TTC TTT GAA GAA GAA TCG CAC GTG GAA GCT AAC GGA AAT GAC TTC 1353  
 Arg Phe Phe Glu Glu Glu Ser His Val Glu Ala Asn Gly Asn Asp Phe  
 420 425 430 435  
 AGG TAT GTG CCG TTT GGT GTT GGA CGT AGA AGC TGT CCC GGG ATT ATA 1401  
 Arg Tyr Val Pro Phe Gly Val Gly Arg Arg Ser Cys Pro Gly Ile Ile  
 440 445 450  
 TTG GCA TTA CCT ATT TTG GGG ATC ACC ATT GGT AGG ATG GTC CAG AAC 1449  
 Leu Ala Leu Pro Ile Leu Gly Ile Thr Ile Gly Arg Met Val Gln Asn  
 455 460 465  
 TTC GAG CTT CTT CCT CCA GGA CAG TCT AAA GTG GAT ACT AGT GAG 1497  
 Phe Glu Leu Leu Pro Pro Gly Gln Ser Lys Val Asp Thr Ser Glu  
 470 475 480  
 AAA GGT GGA CAA TTC AGC TTG CAC ATC CTT AAC CAC TCC ATA ATC GTT 1545  
 Lys Gly Gln Phe Ser Leu His Ile Leu Asn His Ser Ile Ile Val  
 485 490 495  
 ATG AAA CCA AGG AAC TGT TAAACTTTCT GCACAAAAAA AGGATGAAGA 1593  
 Met Lys Pro Arg Asn Cys  
 500 505  
 TGACTTTATA AATGTTTGTG AAATCTGTTG AAATATTCCC TTGTTTGCT 1653  
 TTTGTGAGAT GTTTTTGTGT AAAATGTCTT TAAATGGTTG TTCTACGATT 1713  
 GCAATAATAA TTAGTGGTGC TCATTCTTAA AAAAAAAA AA 1735

FIGURE 12D

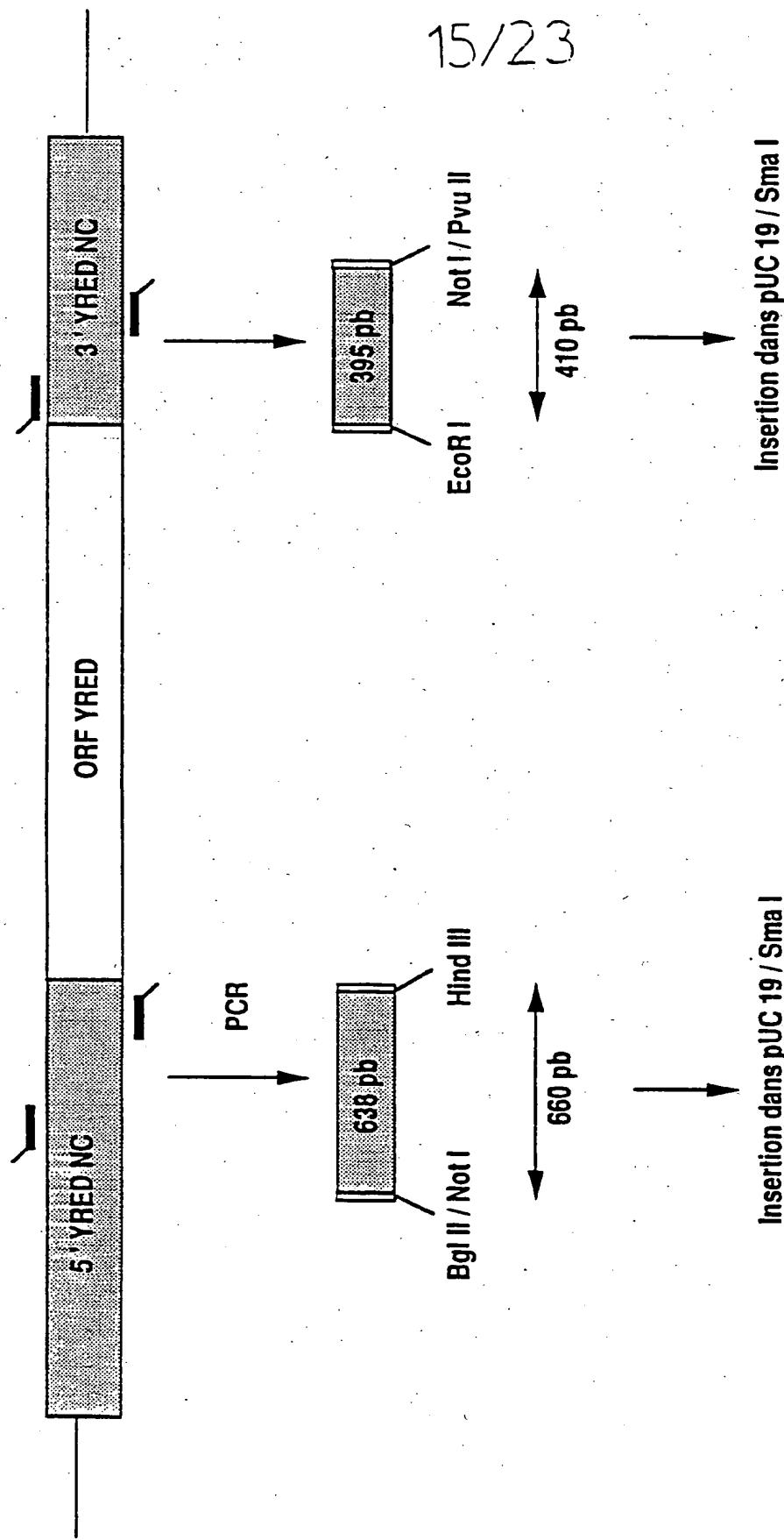
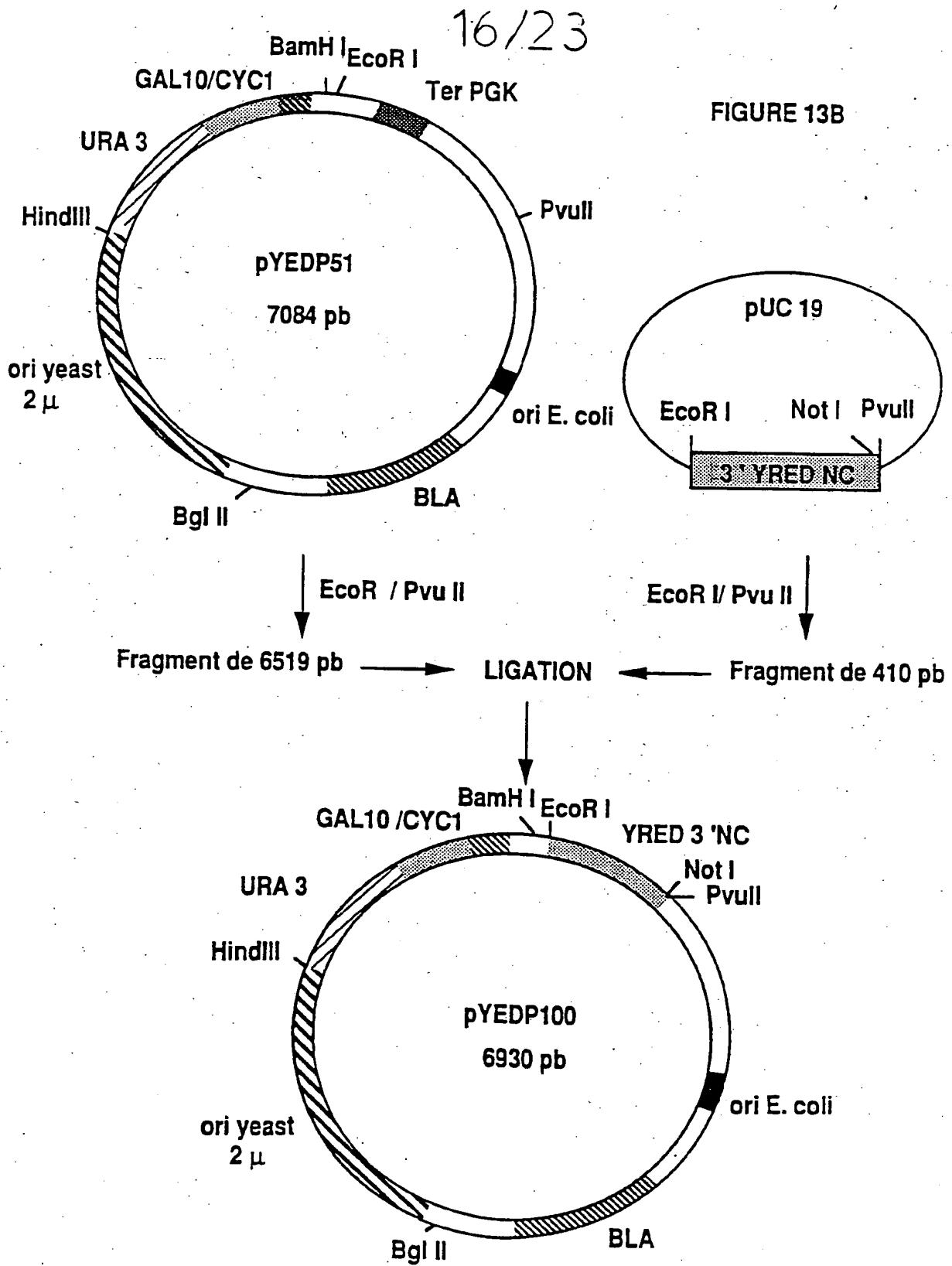


FIGURE 13A



17/23

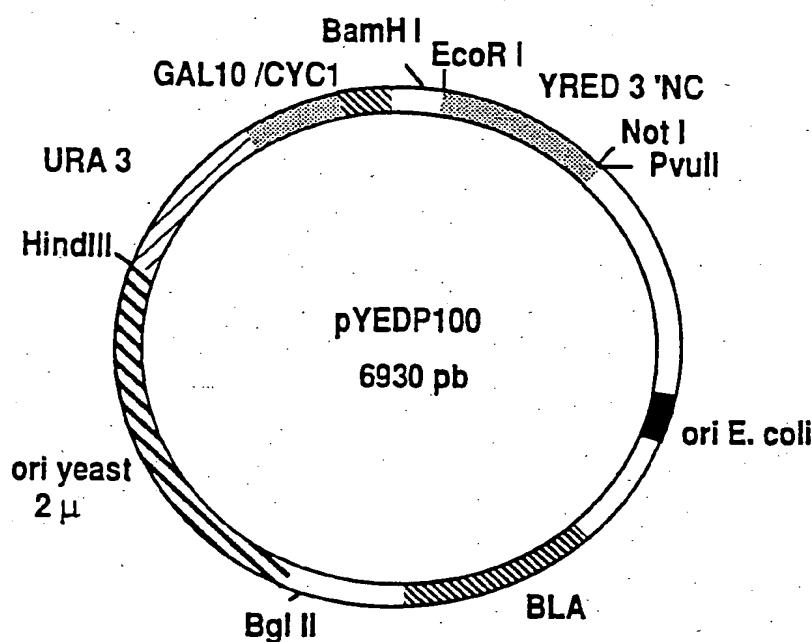
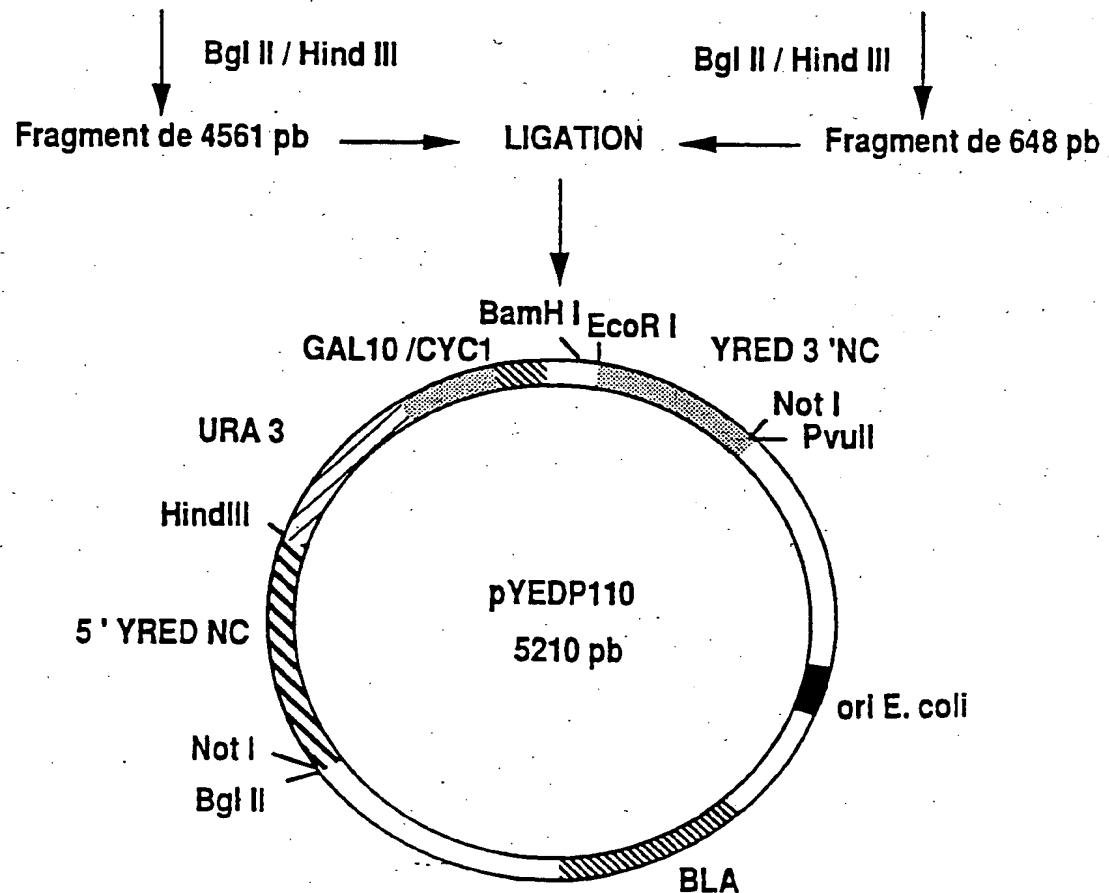
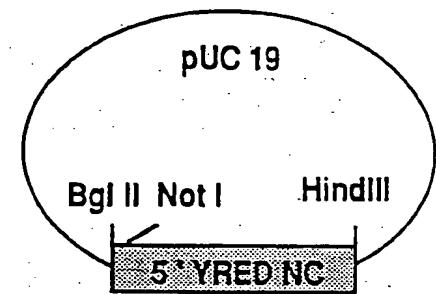


FIGURE 13C



18/23

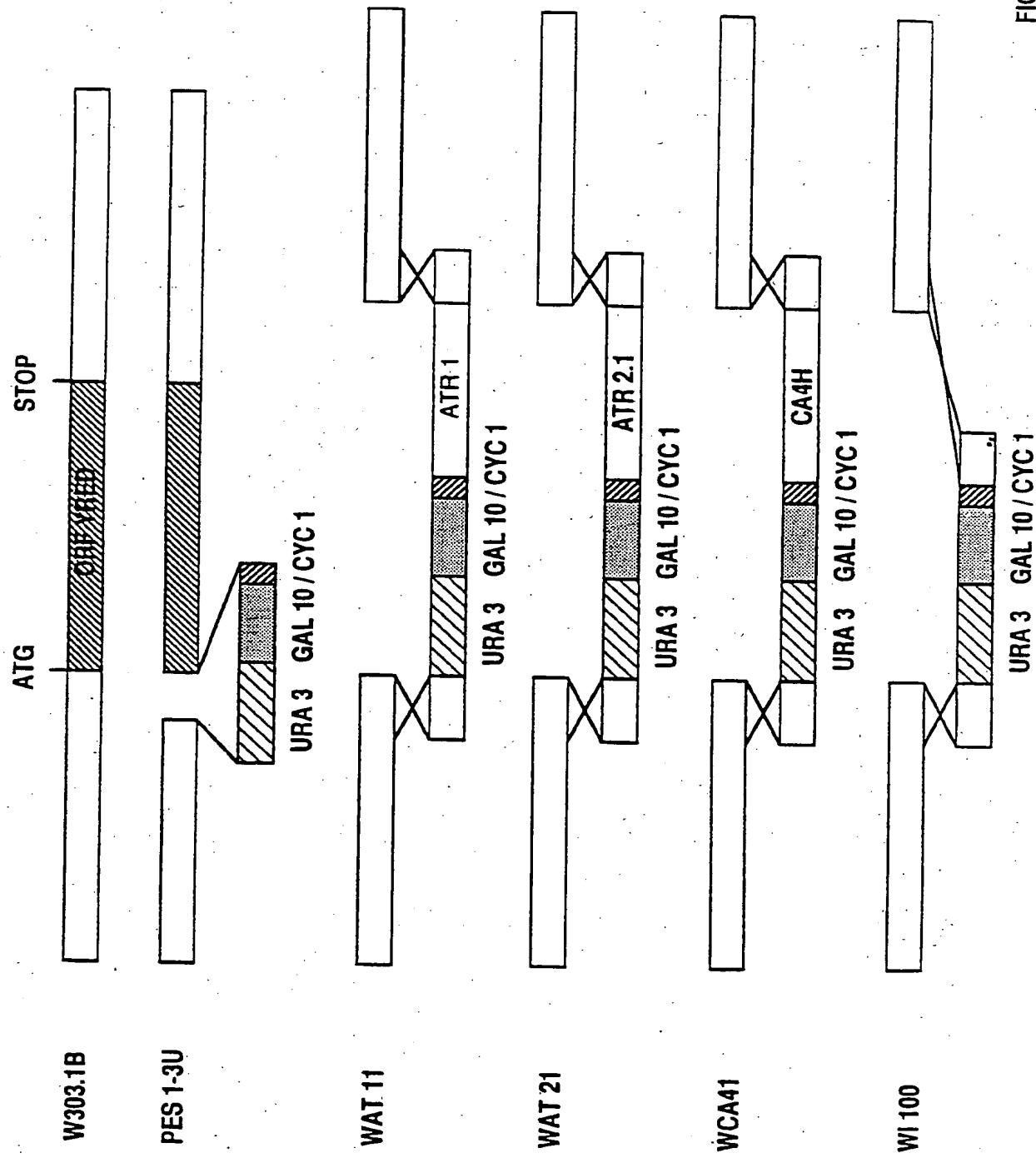


FIGURE 14

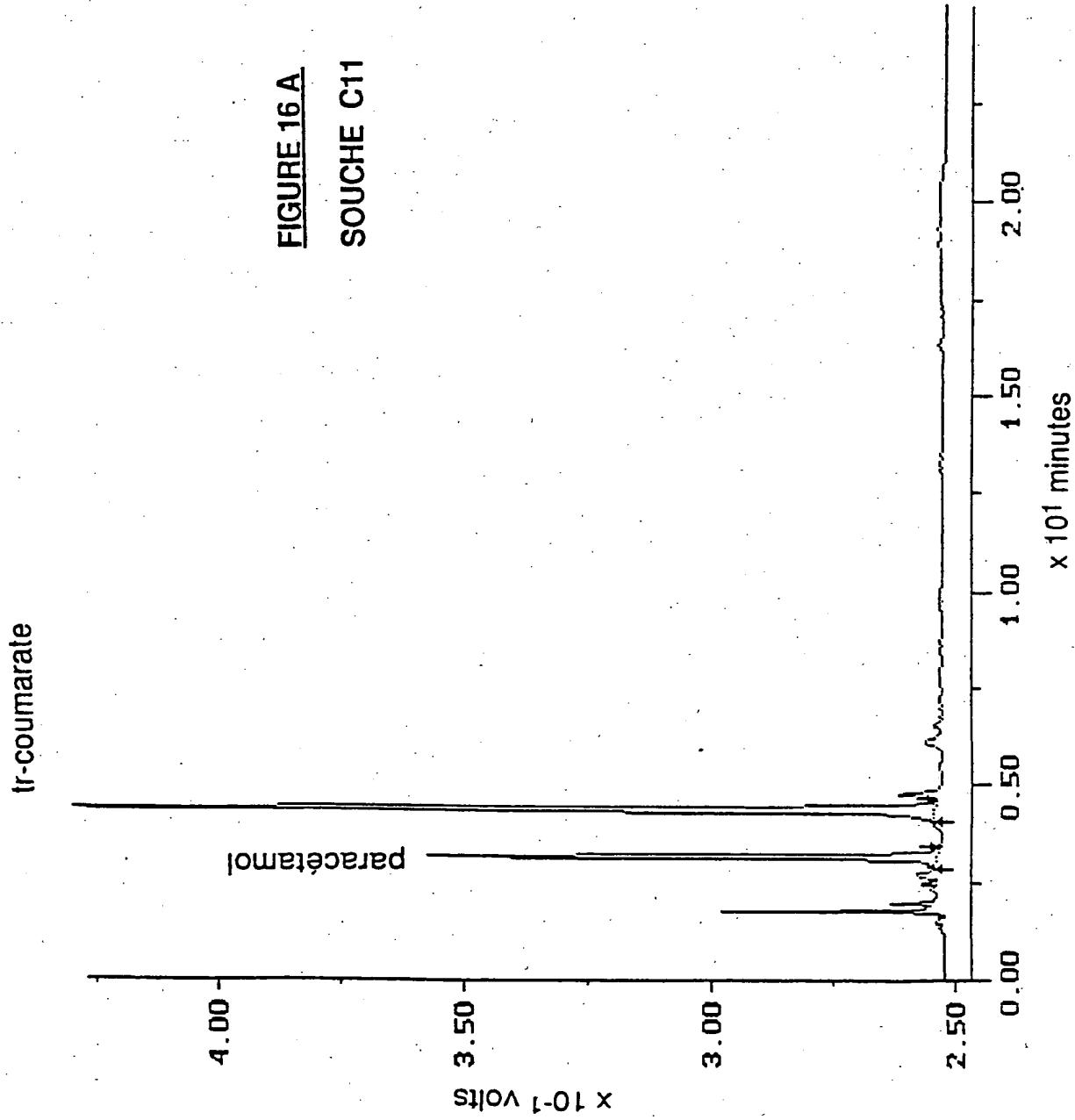
19/23

	Keto <sup>r</sup> ( $\mu$ g/ml)	Activité Rédu.	Bioconv. s. cell.
W303.1B	60	50	nd
PES 1-3U	>60	2000	nd
WRCA	>60	nd	+++
WAT11	>20	100	0
WAT21	>20	800	0
WCA41	2	0	0
WAT11/CA4H	nd	350	+++
WAT21/CA4H	nd	520	+++
WCA41/ATR1	nd		+++
WCA41/ATR2	nd		+++
C11	nd	70	+++
C21	nd	250	+++
C100	2	0	0
11/11	nd	130	0
21/21	nd	350	0

FIGURE 15

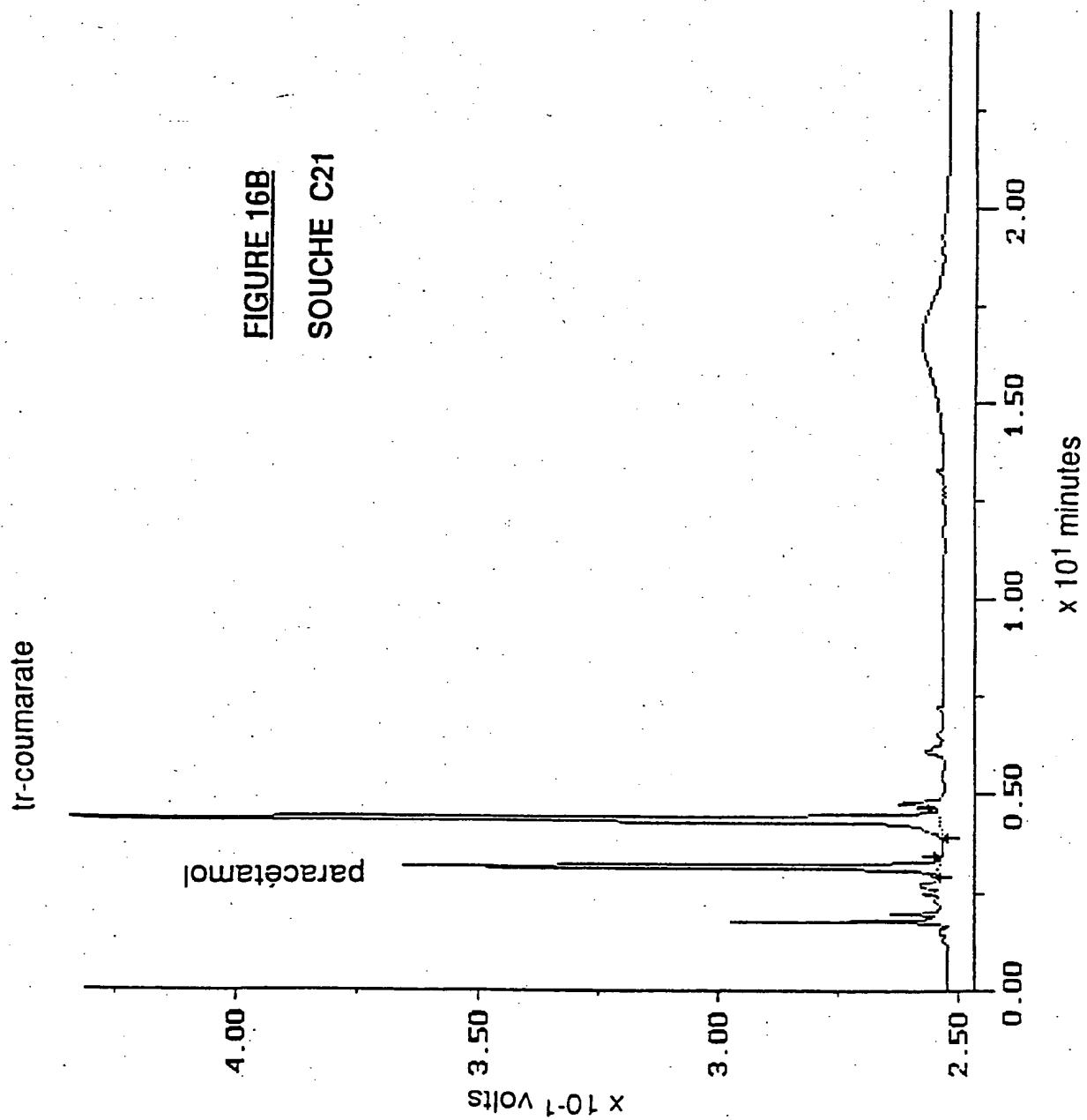
20/23

FIGURE 16 A  
SOUCHE C11



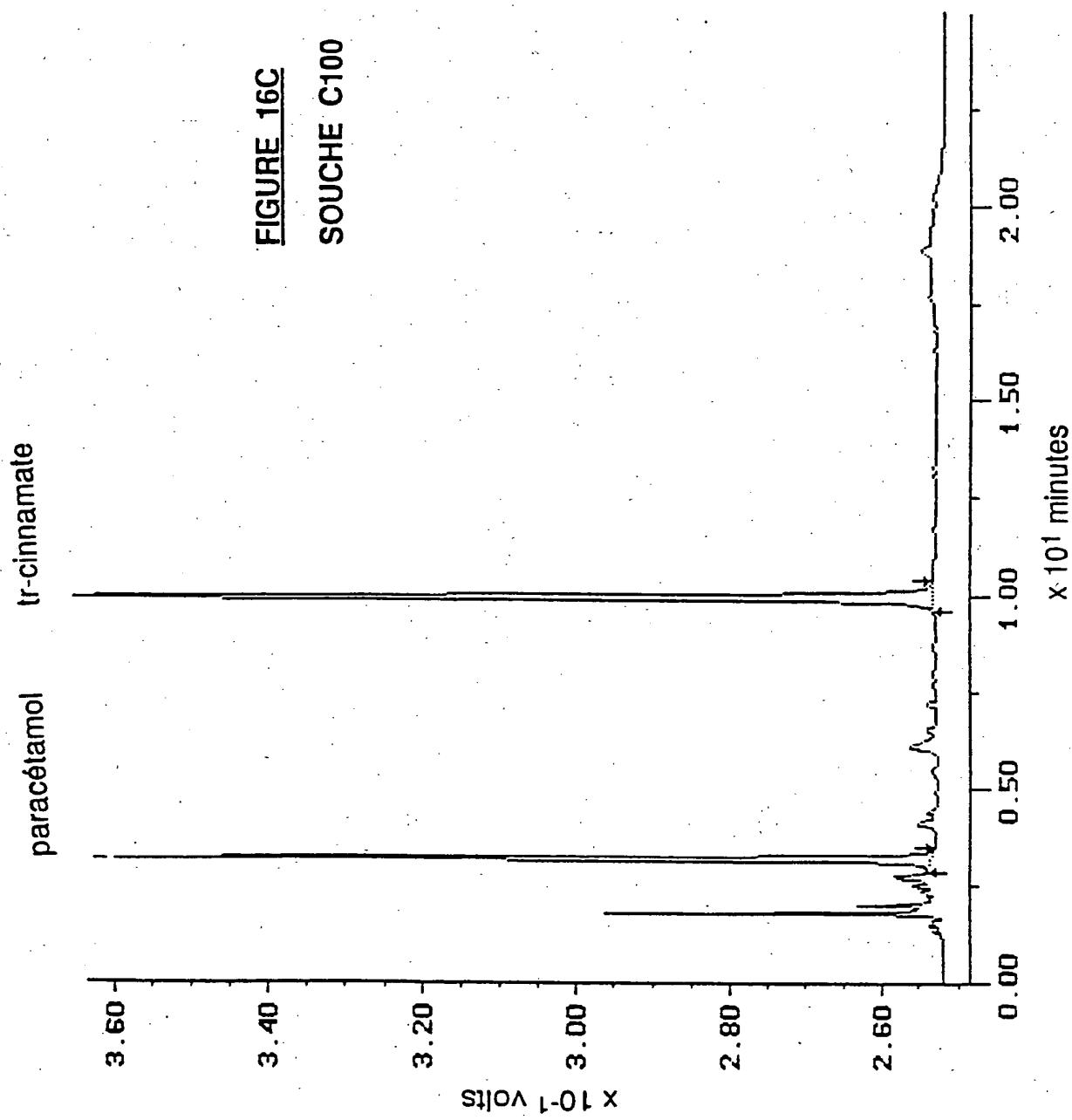
21/23

FIGURE 16B  
SOUCHE C21



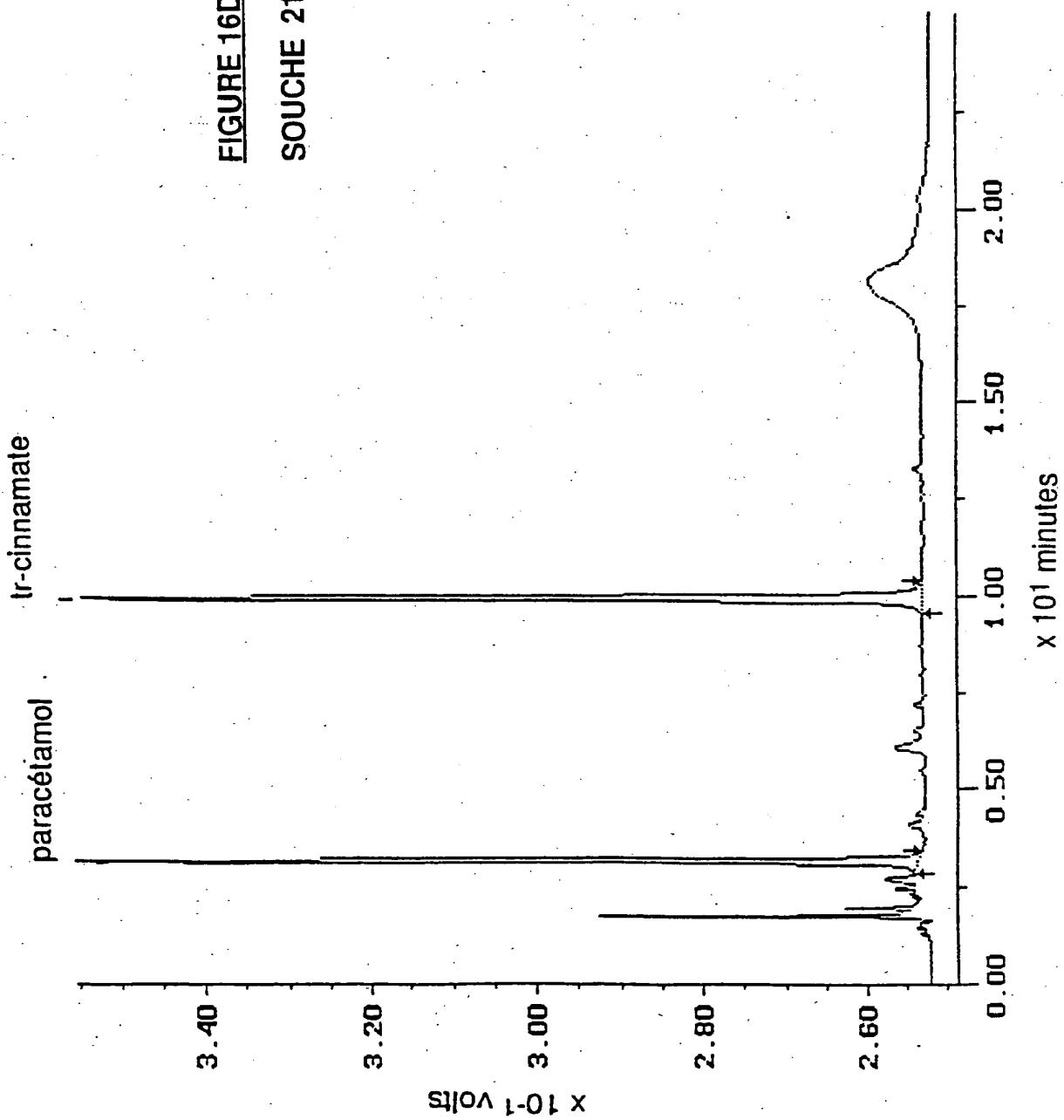
22/23

FIGURE 16C  
SOUCHE C100



23/23

FIGURE 16D  
SOUCHE 21/21



## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/FR 93/00676

## A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

Int.Cl.<sup>5</sup> C12N15/53

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

## B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

Int.Cl.<sup>5</sup> C12N

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

## C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	WO,A,9114781 (HENKEL RESEARCH CORP.) 03 November 1991, page 2, lines 20-25, claim A, page 5, lines 33,34	1-4,9, 14-15, 25-29 24
A		
Y	DNA,Vol.5, No.1, 1986, pages 1-10, New York, US, H. MURAKAMI et al.: "Expression of Rat NADPH-Cytochrome P-450 Reductase cDNA in Saccharomyces cerevisiae", the whole document	1,25
Y	DATABASE WPIL, Derwent Publications Ltd., London, GB,DATABASE WPIL, AN 89-357919 [49], week 8949, & EP-A-344459 (PHILLIPS PETROLEUM CO) 26.12.1989, abstract	1,25 . / ...

<input type="checkbox"/>	Further documents are listed in the continuation of Box C.	<input type="checkbox"/>	See patent family annex.
--------------------------	------------------------------------------------------------	--------------------------	--------------------------

* Special categories of cited documents:	
"A"	document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
"E"	earlier document but published on or after the international filing date
"L"	document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
"O"	document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
"P"	document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed
"T"	later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
"X"	document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
"Y"	document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art
"&"	document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search	Date of mailing of the international search report
29 October 1993 (29.10.93)	07 December 1993 (07.12.93)
Name and mailing address of the ISA/ EUROPEAN PATENT OFFICE	Authorized officer
Faxsimile No.	Telephone No.

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/FR 93/00676

## C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	JOURNAL OF BIOCHEMISTRY, Vol.108, No.5, 1990, pages 859-865, Tokyo, JP, H.MURAKAMI et al.: "Expression of cloned yeast NADPH-cytochrome P450 reductase gene in <i>saccharomyces cerevisiae</i> ", the whole document	1,2,9, 10,15- 17,19
A	BIOLOGICAL ABSTRACTS, Vol.86, 1986, abstract N0.262670, Philadelphia, PA,US,I. BENVENISTE et al.: " Purification and characterization of the NADPH-cytochrome P-450 cytochrome fraction", & BIOCHEM J 235 (2), 1986, pages 365-374, abstract	6,7,13
A	DATABASE WPIL, Derwent Publications Ltd., London, GB, DATABASE WPIL, AN 90-301024 [40], week 9040, & JP - A - 2211880 (AGENCY OF IND SCI TECH) 23.08.1990, abstract	8

**ANNEX TO THE INTERNATIONAL SEARCH REPORT  
ON INTERNATIONAL PATENT APPLICATION NO.**

**FR 9300676**

**SA 76585**

This annex lists the patent family members relating to the patent documents cited in the above-mentioned international search report.  
The members are as contained in the European Patent Office EDP file on 09/11/93  
The European Patent Office is in no way liable for these particulars which are merely given for the purpose of information.

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO-A- 9114781	03-10-91	None	

# RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Demande Internationale N°

PCT/FR 93/00676

## I. CLASSEMENT DE L'INVENTION (si plusieurs symboles de classification sont applicables, les indiquer tous) <sup>7</sup>

Selon la classification internationale des brevets (CIB) ou à la fois selon la classification nationale et la CIB  
Int.C1.5 C 12 N 15/53

## II. DOMAINES SUR LESQUELS LA RECHERCHE A PORTE

Documentation minimale consultée<sup>8</sup>

Système de classification	Symboles de classification
Int.C1.5	C 12 N

Documentation consultée autre que la documentation minimale dans la mesure où de tels documents font partie des domaines sur lesquels la recherche a porté<sup>9</sup>

## III. DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS<sup>10</sup>

Catégorie <sup>11</sup>	Identification des documents cités, avec indication, si nécessaire, <sup>12</sup> des passages pertinents <sup>13</sup>	No. des revendications visées <sup>14</sup>
X	WO,A,9114781 (HENKEL RESEARCH CORP.) 3 novembre 1991, page 2, lignes 20-25, revendication A, page 5, lignes 33,34	1-4,9, 14,15, 25-29 24
A	---	
Y	DNA, vol. 5, no. 1, 1986, pages 1-10, New York, US, H. MURAKAMI et al.: "Expression of Rat NADPH-Cytochrome P-450 Reductase cDNA in Saccharomyces cerevisiae", le document en entier	1,25
Y	DATABASE WPIL, Derwent Publications Ltd., London, GB, DATABASE WPIL, AN 89-357919 [49], week 8949, & EP -A - 344459 (PHILLIPS PETROLEUM CO) 26.12.1989, abrégé ----	1,25
		-/-

<sup>10</sup> Catégories spéciales de documents cités:<sup>11</sup>

- "A" document définissant l'état général de la technique, non considéré comme particulièrement pertinent
- "E" document antérieur, mais publié à la date de dépôt international ou après cette date
- "L" document pouvant jeter un doute sur une revendication de priorité ou cité pour déterminer la date de publication d'une autre citation ou pour une raison spéciale (telle qu'indiquée)
- "O" document se référant à une divulgation orale, à un usage, à une exposition ou tous autres moyens
- "P" document publié avant la date de dépôt international, mais postérieurement à la date de priorité revendiquée

- "T" document ultérieur publié postérieurement à la date de dépôt international ou à la date de priorité et n'appartenant pas à l'état de la technique pertinent, mais cité pour comprendre le principe ou la théorie constituant la base de l'invention
- "X" document particulièrement pertinent; l'invention revendiquée ne peut être considérée comme nouvelle ou comme impliquant une activité inventive
- "Y" document particulièrement pertinent; l'invention revendiquée ne peut être considérée comme impliquant une activité inventive lorsque le document est associé à un ou plusieurs autres documents de même nature, cette combinaison étant évidente pour une personne du métier.
- "&" document qui fait partie de la même famille de brevets

## IV. CERTIFICATION

Date à laquelle la recherche internationale a été effectivement achevée  
29-10-1993

Date d'expédition du présent rapport de recherche internationale  
07.12.93

Administration chargée de la recherche internationale  
OFFICE EUROPEEN DES BREVETS

Signature du fonctionnaire autorisé  
GURDJIAN

III. DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS <sup>14</sup>		(SUITE DES RENSEIGNEMENTS INDIQUE SUR LA DEUXIEME FEUILLE)
Catégorie <sup>15</sup>	Identification des documents cités, <sup>16</sup> avec indication, si nécessaire des passages pertinents <sup>17</sup>	No. des revendications visées <sup>18</sup>
A	JOURNAL OF BIOCHEMISTRY, vol. 108, no. 5, 1990, pages 859-865, Tokyo, JP, H. MURAKAMI et al.: "Expression of cloned yeast NADPH-cytochrome P450 reductase gene in <i>Saccharomyces cerevisiae</i> ", le document en entier ---	1,2,9, 10,15- 17,19
A	BIOLOGICAL ABSTRACTS, vol. 86, 1986, abrégé no. 262670, Philadelphia, PA, US, I. BENVENISTE et al.: "Purification and characterization of the NADPH-cytochrome P-450 cytochrome C reductase from higher-plant microsomal fraction", & BIOCHEM J 235 (2), 1986, pages 365-374, abrégé ---	6,7,13
A	DATABASE WPIL, Derwent Publications Ltd., London, GB, DATABASE WPIL, AN 90-301024 [40], week 9040, & JP - A - 2211880 (AGENCY OF IND SCI TECH) 23.08.1990, abrégé ----	8

**ANNEXE AU RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE  
RELATIF A LA DEMANDE INTERNATIONALE NO.**

FR 9300676  
SA 76585

La présente annexe indique les membres de la famille de brevets relatifs aux documents brevets cités dans le rapport de recherche internationale visé ci-dessus.

Lesdits membres sont contenus au fichier informatique de l'Office européen des brevets à la date du 09/11/93.  
Les renseignements fournis sont donnés à titre indicatif et n'engagent pas la responsabilité de l'Office européen des brevets.

Document brevet cité au rapport de recherche	Date de publication	Membre(s) de la famille de brevett(s)	Date de publication
WO-A- 9114781	03-10-91	Aucun	